

**PENGARUH TERAPI PREVENTIF MADU HUTAN SUMBAWA
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)
DAN HISTOPATOLOGI DUODENUM TIKUS
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
PLUMBUM ASETAT**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

DIANA ANGGRAENI

135130101111045



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa
Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan
Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus
norvegicus*) yang Diinduksi
Plumbum Asetat**

Oleh :
DIANA ANGGRAENI
135130101111045

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 7 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Dra. Herawati, MP

NIP. 195804127 198503 2 001

drh. Fajar Shoddiq P, M. Biotech

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Diana Anggraeni

NIM : 135130101111045

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi Berjudul:

Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum Asetat

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dan skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaksud di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 8 April 2018

Yang menyatakan,

(Diana Anggraeni)

NIM. 135130101111045

Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum Asetat

ABSTRAK

Pencemaran plumbum (Pb) dapat menjadi sumber radikal bebas yang dapat menyebabkan terganggunya metabolisme tubuh. Stress oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid yang mengakibatkan terjadi kenaikan MDA. Peroksidasi lipid yang tinggi dapat mempengaruhi kerusakan jaringan mukosa duodenum. Tubuh membutuhkan antioksidan untuk melawan radikal bebas. Madu hutan Sumbawa mengandung antioksidan berupa senyawa flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap kadar Malondialdehida (MDA) dan histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum asetat. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih strain Wistar berjumlah 20 tikus yang dibagi 5 kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif, kontrol positif dengan pemberian plumbum asetat 10 mg/ekor/hari selama 14 hari, dan kelompok terapi preventif dengan madu hutan Sumbawa 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB dan 75 mg/kgBB selama 28 hari dan induksi plumbum asetat dosis 10 mg/ekor/hari selama 14 hari. Kadar MDA duodenum dianalisa dengan metode spektrofotometri dan histopatologi duodenum menggunakan pewarnaan *Hematoxylin eosin* (HE) yang diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali. Kadar MDA dianalisa menggunakan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan uji *Tukey* ($\alpha = 5\%$). Gambaran histopatologi duodenum dianalisis secara kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi preventif madu hutan Sumbawa dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan ($P < 0,05$) dan mencegah kerusakan histopatologi duodenum pada tikus dengan dosis terbaik yaitu 75 mg/Kg BB. Kesimpulan dari penelitian ini adalah madu hutan Sumbawa dapat digunakan sebagai terapi preventif untuk menurunkan radikal bebas akibat induksi plumbum asetat.

Kata kunci: Duodenum, Madu hutan Sumbawa, MDA, Plumbum Asetat

The Preventive Therapy of Sumbawa Forest Honey on Malondialdehyde (MDA) and Duodenum Histopathology on Rats Induced by Lead Acetate

ABSTRACT

Pollution of lead ion can be a source of free radicals that can cause disruption of the body's metabolism. Oxidative stress causes lipid peroxidation resulting in increased MDA. High lipid peroxidation can affect the destruction of the duodenal mucosa tissue. The body needs antioxidant to prevent free radicals. Sumbawa forest honey contains the antioxidants such as flavonoid. The purpose of this research was to determine the preventive therapy of Sumbawa forest honey on Malondialdehyde (MDA) and duodenum histopathology on rats induced by lead ion. The experimental animals used were white rat Wistar strain amounted 20 rats conducted in 5 different groups, namely negative control group, positive control group that induced by lead ion, and preventive therapy groups with Sumbawa forest honey dose of 25 mg/kgBW, 50 mg/kgBW and 75 mg/kgBW for 28 days and administered with lead ion dose of 10 mg/day for 14 days. MDA duodenum levels were analyzed by spectrophotometric method and histopathology duodenum using *Hematoxylin eosin* (HE) staining was observed using a light microscope magnification 400 x. MDA levels were analyzed using One Way ANOVA test and continued with Turkey test ($\alpha = 5\%$). The description of duodenal histopathology was analyzed qualitatively. The results showed that Sumbawa forest honey preventive therapy could significantly decrease MDA levels ($P < 0.05$) and prevent damage the histopathology of duodenum in rat with the best dose of 75 mg / KgBW. The conclusion from this research that Sumbawa forest honey can be used as preventive therapy to decrease free radical due to induction of plumbum acetate.

Key words: Duodenum, Sumbawa forest honey, MDA, Lead Acetate

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul : Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum Asetat telah selesai dilaksanakan. Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Naskah skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Dra. Herawati, MP selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
2. drh. Fajar Shoddiq Permata, M. Biotech sebagai dosen pembimbing kedua atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. Dhita Evi Aryani, S. Farm, Apt selaku dosen penguji yang membantu dalam proses penelitian penulis hingga selesai.
4. drh. Rahadi Swastomo, M. Biomed selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.

6. Orangtua tercinta Ayahanda Dwi Saras dan Ibunda Yudiyanti yang sangat istimewa dalam memberikan dukungan, bantuan, semangat, doa dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
7. Seluruh teman di Queen of Kepet, di kontrakan Wanita Paripurna serta teman-teman kelompok penelitian Cindy Oktati Kasari, Olenka Putri Windiarko, Arnes Mardasella dan Putri Stefy Graf yang senantiasa memberikan saran, kritik, motivasi semangat, inspirasi, bantuan, kebersamaan, keceriaan dan semua hal yang sangat luar biasa.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan proposal skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, 8 April 2018

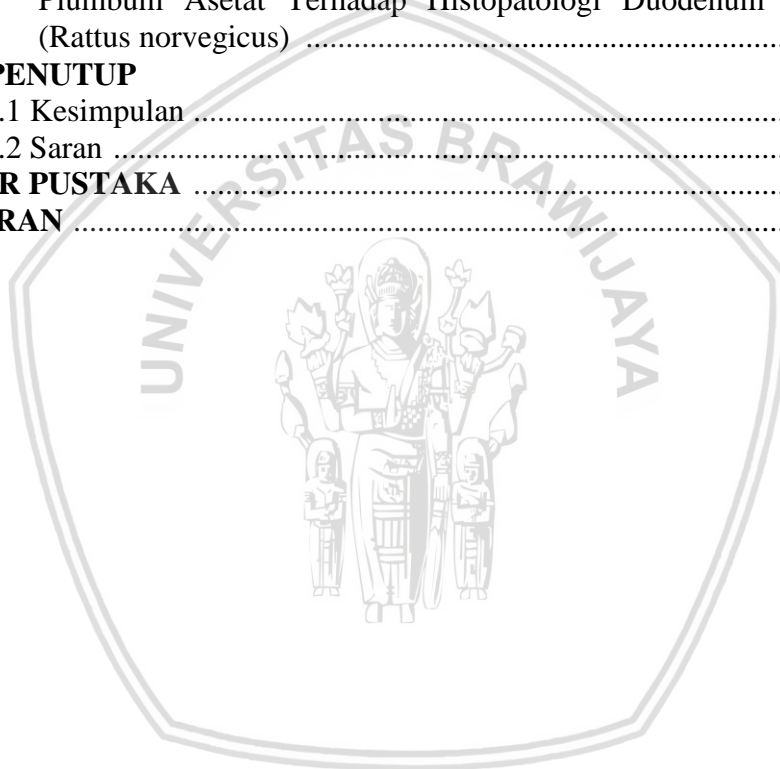
(Diana Anggraeni)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Organ Duodenum	8
2.1.1 Histologi duodenum	9
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	10
2.3 Madu Hutan Sumbawa	12
2.4 Paparan Plumbum Asetat dan Bahanya	19
2.5 Mekanisme Toksisitas Plumbum Asetat	21
2.6 Malondialdehida (MDA)	22
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	25
3.2 Hipotesis Penelitian	28
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	29
4.2.1 Alat Penelitian	29
4.2.2 Bahan Penelitian	29
4.3 Tahapan Penelitian	30
4.3.1 Rancangan Penelitian	30
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian	31
4.3.3 Variabel Penelitian	31
4.4 Karakteristik Sampel Penelitian	32
4.4.1 Karakteristik Inklusi	32
4.4.2 Karakteristik Eksekusi	32
4.5 Prosedur Kerja	32
4.5.1 Persiapan Hewan Coba	32
4.5.2 Penentuan Dosis Madu	33
4.5.3 Pemberian Plumbum Asetat	34



4.5.4 Pengambilan Organ Duodenum Tikus.....	34
4.5.5 Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA)	35
4.5.6 Histopatologi Duodenum.....	36
4.5.6.1 Pembuatan Preparat dan Pewarnaan <i>Hematoxyline Eosin</i> (HE) Histopatologi Duodenum.....	36
4.5.6.2 Pengamatan Histopatologi	38
4.6 Analisa Data.....	38
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum Asetat Terhadap Kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA)	39
5.2 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum Asetat Terhadap Histopatologi Duodenum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	45
BAB 6 PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	56
6.2 Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	64



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Persyaratan Kualitas Madu.....	14
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian	30
5.1 Hasil Pengukuran Peningkatan dan Penurunan MDA	39
8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	81
8.2 Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Standar MDA dengan Panjang Gelombang Maksimum 530 nm	82
8.3 Data Absorbansi MDA	82
9.1 Peningkatan dan Penurunan Kadar MDA	83

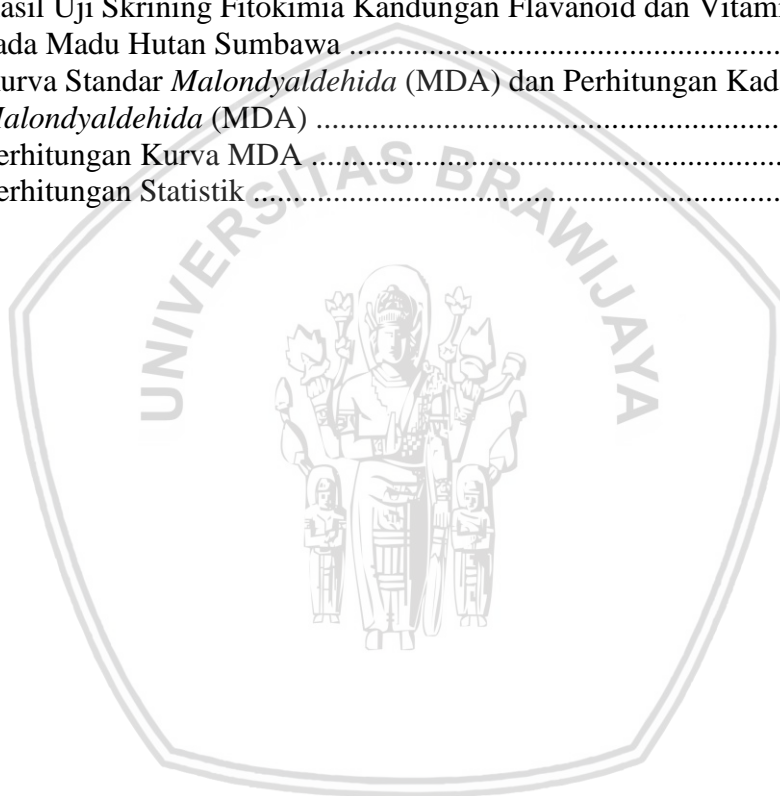


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambaran Histopatologi duodenum	10
2.2 Tikus strain wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).....	12
2.3 Pb dalam menghambat produksi Hb.....	22
2.4 Mekanisme pembentukan MDA.....	24
3.1 Kerangka Konseptual.....	25
5.2.1 Histopatologi Organ Duodenum Tikus sehat (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	45
5.2.2 Histopatologi organ duodenum tikus yang diinduksi plumbum asetat (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	46
5.2.3 Histopatologi organ duodenum tikus terapi preventif dosis 25 mg/Kg BB (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	46
5.2.4 Histopatologi organ duodenum tikus terapi preventif dosis 50 mg/Kg BB (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	47
5.2.5 Histopatologi organ duodenum tikus terapi preventif dosis 75 mg/Kg BB (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Rancangan Penelitian.....	68
2. Perhitungan dosis Madu Hutan Sumbawa	69
3. Pemberian Plumbum Asetat.....	72
4. Isolasi Organ Duodenum	73
5. Langkah Kerja Penelitian.....	74
6. Sertifikat Laik Etik Penggunaan Hewan Model.....	78
7. Hasil Uji Skrining Fitokimia Kandungan Flavanoid dan Vitamin C pada Madu Hutan Sumbawa	79
8. Kurva Standar <i>Malondyaldehida</i> (MDA) dan Perhitungan Kadar <i>Malondyaldehida</i> (MDA)	81
9. Perhitungan Kurva MDA	83
10. Perhitungan Statistik	86



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
A	: Alfa
g	: Gram
°C	: Derajatcelcius
%	: Persen
μL	: Mikroliter
mL	: Mililiter
mm	: Milimeter
cm	: Centimeter
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
m ³	: Meter kubik
cc	: Cubic Centimeter
L	: Liter
DNA	: <i>Deoxyribose-nucleic acid</i>
BB	: Berat Badan
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
Pb	: Plumbum
Na Thio	: <i>Sodium thiosulfate</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
VDLD	: <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
LDL	: <i>low density lipoprotein</i>
PFA	: <i>Paraformaldehida</i>
LD ₅₀	: <i>lethal dose</i>
μL	: Mikroliter
μm	: Mikrometer
TCA	: <i>Thichloroacetic acid</i>
HCl	: Hidrogen Klorida
BNJ	: Beda Nyata Jujur
OH	: <i>Hidroksil</i>
H	: Hidrogen
OO	: <i>Peroksil</i>
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
O ₂	: Oksigen
O ²⁻	: <i>Superoksida</i>

MDA	: <i>Malondialdehida</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated fatty acids</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
pH	: <i>Potential of Hydrogen</i>
BNF	: <i>Buffer Neural Formalin</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
rpm	: <i>Revolutions per minute</i>
ppm	: <i>Part per million</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
NaCl	: <i>Natrium Chlorida</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Manusia dan hewan dapat terpapar logam berat dilingkungan kehidupannya sehari – hari. Pencemaran logam berat sangat berbahaya bagi lingkungan terutama oleh logam berat pada kawasan perairan dan industri, baik akibat penggunaan air untuk konsumsi sehari-hari ataupun ketika mengkonsumsi biota air tawar yang hidup di perairan tercemar. Air yang cukup dan layak masuk ke dalam tubuh akan membantu fungsi tubuh dengan sempurna, namun gangguan kesehatan terjadi bila air yang dikonsumsi mengandung bahan kimia berbahaya dan beracun meskipun dalam konsentrasi rendah seperti merkuri (Hg), plumbum (Pb), kadmium (Cd) dan Arsen (As) (Triyanti, 2011).

Kadar plumbum dalam lingkungan meningkat lebih dari seribu kali selama tiga abad sebagai hasil dari aktivitas manusia. Industri yang banyak menghasilkan plumbum (Pb) antara lain adalah industri peleburan dan penyulingan, industri kuningan atau perunggu, industri karet dan plastik, industri baja, pabrik manufaktur baterai, dan industri manufaktur timbal. Plumbum dapat memasuki lingkungan melalui pelepasan dari pertambangan Pb dan mineral lainnya, dari pabrik yang menggunakan Pb, campuran Pb, atau senyawa yang mengandung Pb. Pb dilepaskan ke udara saat pembakaran batu bara, minyak, atau limbah. Di udara bebas, Pb dapat bergerak sampai ke tempat yang jauh jika partikelnya kecil dan akan dibersihkan dari udara oleh hujan dan akan jatuh ke daratan maupun perairan (Jannah, 2017).

Orang yang tinggal dekat dengan tempat pembuangan limbah dapat terpapar Pb dan zat kimia yang mengandung Pb. Dari udara yang dihirup, air yang diminum, makanan atau debu yang mengandung plumbum yang tanpa sengaja tertelan. Contoh pada kasus hewan, berasal dari permasalahan keamanan pangan di 3 daerah di Propinsi Jawa Tengah yaitu Semarang, Surakarta dan Sragen dari sumber daging yakni ditemukan banyaknya sapi yang digembalakan di lokasi Tempat Pembuangan Akhir (TPA) yang dagingnya terkontaminasi logam berat dari bahan pakannya yaitu sampah di lokasi TPA. Pencemaran daging hewan ternak oleh logam berat dapat menimbulkan bahaya bagi kesehatan manusia (Suyanto *et al*, 2010). Air di rumah-rumah yang menggunakan pipa timbal dapat mengandung Pb. Bahan makanan dan minuman yang tercemar oleh Pb ini tentu sangat berbahaya bagi organisme yang mengkonsumsinya terutama manusia dan hewan meskipun kadarnya masih rendah, pemaparan yang berlangsung dalam jangka waktu lama akan menyebabkan efek yang kronis (Widowati *et al*, 2009).

Paparan Pb berlebih menjadi masalah penting di dunia dan merupakan resiko kesehatan lingkungan utama yang dihadapi berbagai negara baik di negara maju maupun di negara berkembang. Keracunan Pb merupakan senyawa toksik dengan efek kronis, sehingga semakin lama seseorang atau hewan terpapar maka akan terjadi peningkatan kumulatif. Efek yang ditimbulkan adalah gangguan terhadap berbagai sistem organ seperti darah, syaraf, ginjal, reproduksi, dan saluran cerna (AOEC, 2010; Suksmerri, 2008). Senyawa alkil dan naftenat timbal dapat terabsorpsi melalui kulit. Paparan Pb dengan konsentrasi 1 mg/L selama 60 sampai 114 jam dapat menyebabkan kematian ikan mas. Sedangkan pada belut dapat

mengalami kematian dengan konsentrasi 3 ml/L selama 21 hari (Metlev, 1983). Efek Pb dengan dosis 10 mg/ekor/hari dapat mempengaruhi gambaran histopatologi duodenum, yaitu senyawa timbal dapat menyebabkan hiperplasia sel goblet, hemoragi, dan sel piknotik (Devianty, 2016).

Paparan Pb yang masuk ke dalam tubuh menyebabkan terbentuknya radikal bebas dalam tubuh yang akan menghambat aktivitas antioksidan endogen seperti kadar *Malondialdehida* (MDA). Keberadaan Pb dalam jaringan dan cairan tubuh dapat berpengaruh dan mengakibatkan berbagai gangguan fungsi jaringan dan metabolisme. Hal ini disebabkan karena ekskresi Pb cenderung lambat dan menetap dalam tubuh sehingga pada akhirnya akan menumpuk dalam jaringan tubuh sampai mencapai tingkat yang bersifat racun dan menyebabkan kerusakan pada organ-organ tertentu. Logam Pb diekskresikan jauh lebih lambat dibandingkan absorpsinya dan sebagai akibatnya akan tertimbun dalam jaringan lunak seperti hepar, limpa, otak, dan tulang. Plumbum yang tinggi dalam tubuh juga akan mempengaruhi sistem pencernaan, sistem hemopoetik, sistem syaraf dan ginjal (Sharma, 2014).

Penyerapan plumbum sebanyak 30-40% yang terabsorpsi akan masuk ke dalam aliran darah lalu 95% Pb akan diikat oleh eritrosit. Sekitar 30% dari jumlah yang terhisap melalui hidung akan diabsorpsi saluran pernafasan dan akan tinggal didalam tubuh. Plumbum yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan akan dicerna bersama makanan dan diabsorpsi dalam usus halus sekitar 5%–10% dari jumlah yang ditelan. Usus halus merupakan tempat digesti terakhir dan tempat absorpsi zat makanan. Jika terdapat benda asing yang bersifat toksik maka akan

terdapat akumulasi zat toksik tersebut dan mengganggu sistem penyerapan sari-sari makanan yang terjadi di dalam usus halus terutama pada duodenum. Setelah diabsorpsi, kemudian masuk ke dalam sirkulasi darah dan didistribusikan ke berbagai organ dalam tubuh terutama pada tulang. Plumbum yang melalui hati dan ginjal dapat diekskresikan melalui feses dan urin (Palar, 2008).

Induksi plumbum astat dapat menyebabkan kerusakan jaringan seperti erosi dan ulcer pada mukosa lambung, usus halus, perdarahan kolon serta menginduksi pelepasan sel inflamasi seperti neutrofil, limfosit, monosit, dan makrofag yang berperan dalam fagositosis (Bures *et al*, 2011; Suradkar *et al* 2010). Aktivasi sel inflamatori memicu pelepasan Reaktif Oxygen Species (ROS) didalam tubuh. Peningkatan ROS yang tidak terkendali akan menyebabkan stres oksidatif dalam tubuh yang meningkatkan reaksi peroksidasi lipid membran sel yang menghasilkan produk samping berupa malondialdehid (MDA). Senyawa MDA yang kemudian dilepaskan ke jaringan, sehingga kadar MDA dalam jaringan dapat dijadikan sebagai penanda peningkatan ROS dalam tubuh. Malondialdehid yang dihasilkan memiliki sifat toksik terhadap sel-sel duodenum sehingga menyebabkan kematian sel-sel yang mempengaruhi gambaran histologi duodenum (Rahardjani, 2010).

Jumlah radikal bebas yang tinggi dalam tubuh juga harus diimbangi dengan adanya antioksidan yang berasal dari luar tubuh (antioksidan eksogen). Antioksidan diperlukan untuk menetralkan radikal bebas. Salah satu yang mengandung senyawa antioksidan adalah madu hutan. Madu hutan memiliki kandungan flavanoid yang cukup tinggi sehingga dapat menjadi antioksidan karena dapat menangkap radikal

bebas dengan membebaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya (Suranto, 2007).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap kadar *Malondialdehida* (MDA) dan mengetahui gambaran histopatologi duodenum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan plumbum asetat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah terapi preventif madu hutan Sumbawa dapat menurunkan kadar *Malondialdehida* (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum asetat?
2. Apakah terapi preventif madu hutan Sumbawa dapat mencegah kerusakan struktur jaringan pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum asetat ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain wistar sejumlah 20 ekor, berumur 8–10 minggu, berat badan rata-rata 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah

memperoleh sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya dengan No. 790-KEP-UB pada **Lampiran 6**.

2. Madu hutan Sumbawa yang digunakan diperoleh dari Sumbawa. Maserasi yang diberikan selama 14 hari berturut – turut dengan dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 75 mg/kg BB untuk masing – masing tikus putih pada setiap perlakuan (Al – Yahya, 2013).
3. Plumbum asetat yang digunakan diperoleh dari CV Makmur Sejati kota Malang dengan merk Pudak Scientific. Pemberian plumbum asetat diberikan sebanyak 10 mg/ekor/hari. Plumbum asetat diberikan dalam bentuk serbuk yang dilarutkan dengan aquades dan diberikan selama 14 hari yang dimulai pada hari ke 15 – 28 (Suprijono dkk., 2011).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar *Malondialdehida* (MDA) menggunakan uji *One Way* ANOVA dilanjutkan uji *Tukey* dianalisa secara kuantitatif dan pengamatan histopatologi duodenum diamati secara kualitatif menggunakan pewarnaan HE dan mikroskop *Olympus* BX51.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap kadar *Malanodialdehida* (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum asetat.

2. Mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum asetat.

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemanfaatan madu hutan Sumbawa sebagai terapi preventif terhadap kerusakan duodenum atau gangguan organ lain sebagai akibat induksi plumbum asetat.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

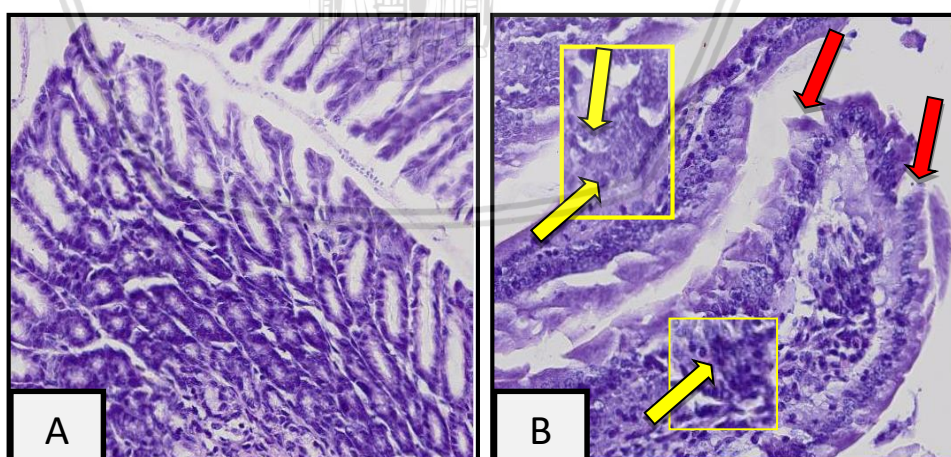
1.1 Organ Duodenum

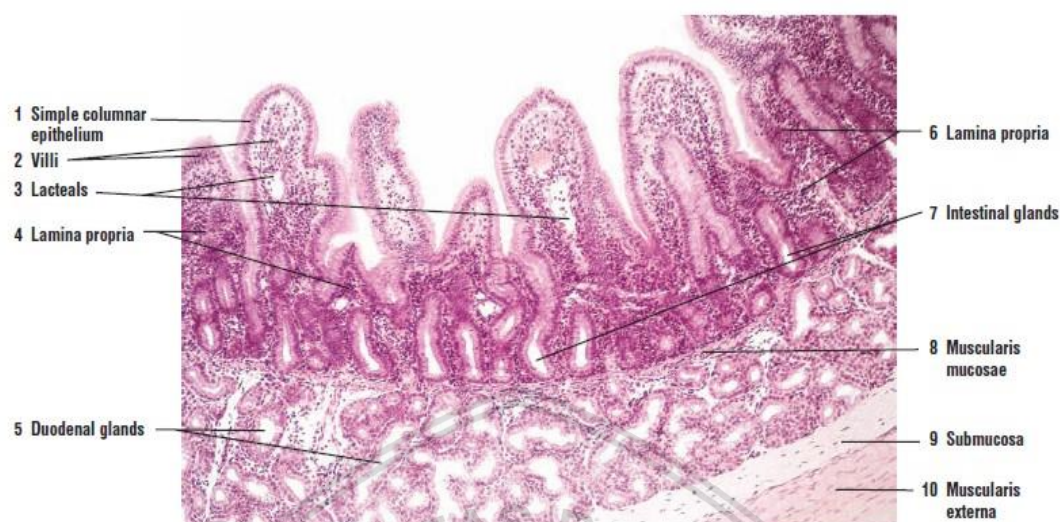
Sistem pencernaan tikus terdiri dari mulut, esophagus, lambung, usus halus dan usus besar. Usus halus merupakan tempat penyerapan makanan, dimana terdiri dari duodenum, jejunum, dan ileum. Duodenum merupakan bagian organ yang dimulai dari akhir pylorus lambung, terletak sebelah kanan vertebrae lumbal 1. Duodenum mengelilingi pankreas dan berhubungan dengan jejunum sebelah kiri vertebrae lumbal (Olaibi, 2014). Duodenum berfungsi untuk mencerna dan mengabsorpsi nutrisi makanan dan air (Hammer and Stephen, 2014). Bahkan menurut Hearn (2007), fungsi absorpsi didukung karena adanya plika sirkularis (valvula koniventes).

Duodenum tersusun atas empat lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, muskularis eksterna, dan tunika serosa atau adventitia (Eroschenko, 2008). Duodenum memiliki epitel simple kolumnar dengan tepi lurik. Diantara sel kolumnar terdapat sel goblet. Mamalia memiliki vili yang pendek (Bacha, 2000), dimana vili berfungsi untuk memperluas permukaan penyerapan, sehingga proses absorpsi nutrisi dapat berjalan dengan baik (Abdullah, 2007). Bagian submukosa, terdapat kelenjar brunner yang menghasilkan mukus bersifat alkalis untuk melindungi dinding duodenum dari asam lambung yang bersifat sangat asam bahkan dapat meningkatkan proliferasi epitel dalam usus halus (Eroschenko, 2008).

1.1.1 Histologi Duodenum



Secara histologis, duodenum pada manusia maupun hewan memiliki jumlah vili yang banyak, tinggi, dan berbentuk seperti lembaran daun. Duodenum juga memiliki kriptas dan kelenjar Lieberkühn dengan jumlah dan keadaan yang paling baik. Selain itu terdapat kelenjar submukosa (Brunner). Jejunum hampir mirip dengan duodenum tetapi vilinya lebih kecil dan lebih sedikit. Jejunum tidak terlalu nampak adanya kelenjar submukosa (Brunner) namun jejunum memiliki banyak sel goblet pada permukaan vilinya. Ileum adalah bagian akhir dari usus halus, bentuk vili seperti ibu jari dengan jumlah kelenjar Lieberkühn yang sedikit. Ileum memiliki jumlah sel goblet yang sedikit namun dilengkapi dengan jaringan limfatik yang besar yaitu daun Peyer (Jonqueira and Carneiro, 2005).





Gambar 2.1 Histopatologi duodenum tikus (*Ratus norvegicus*) dengan pewarnaan Hematoksilin – Eosin (HE) Perbesaran 400x.

Keterangan : A merupakan kondisi normal dari duodenum dimana sel epitel kolumnar masih berjajar rapi pada vili – vili usus.

B  : erosi pada vili duodenum.  : infiltrasi sel radang pada lamina propria (Palupi, *et al* 2013)

C Struktur histologi duodenum (Junqueira *et al*, 2013)

1.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Di Indonesia, binatang percobaan ini sering dinamakan tikus besar, akan tetapi jika lebih kecil lagi dinamakan mencit sehingga akan membingungkan jika semuanya dinamakan tikus. Dibandingkan dengan tikus liar, tikus percobaan lebih cepat dewasa yang tidak ditunjukkan musim kawin dan seringnya berbiak. Tikus liar dapat hidup 4-5 tahun, sedangkan tikus percobaan jarang yang lebih dari 3 tahun. Dua karakteristik yang membedakan tikus putih dengan binatang percobaan yang lain adalah tikus tidak dapat memuntahkan makanan karena susunan anatomi esophagus yang menyatu dengan perut, serta tikus tidak mempunyai kantung empedu. Kelebihan dari tikus putih sebagai binatang percobaan antara lain bersifat

omnivora (pemakan segala), mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia. Selain itu dari segi ekonomi harganya murah, ukurannya kecil dan perkembangannya cepat. Tikus percobaan strain wistar yang dikembangkan secara luas sangat mudah menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Hewan coba merupakan hewan yang dikembangkan untuk digunakan sebagai hewan coba. Tikus sering digunakan dalam berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun, hal ini dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Tikus merupakan hewan yang aktivitasnya pada malam hari (nocturnal) (Adiyanti, 2011).

Klasifikasi tikus putih menurut Sharp and Villano (2013).



Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: <i>Ratus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 2.2 Tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*) (Johnson,2012).

Sebagai hewan percobaan, tikus memiliki beberapa keunggulan, yaitu pemeliharaan dan penanganan mudah, kemampuan reproduksi tinggi dan masa kebuntingan singkat. Selain itu, tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi tidak lazim pada tempat bermuara esofagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses pencekakan perlakuan menggunakan sonde lambung, dan tidak mempunyai kandung empedu. Umur dewasa tikus ini mulai 40-60 hari dengan berat badan rata – rata 150-250 g (Adiyati,2011).

2.3 Madu Hutan Sumbawa

Madu adalah zat manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga tanaman atau bagian lain dari tanaman. Madu merupakan produk yang unik dari hewan, yang mengandung persentase karbohidrat yang tinggi, praktis tidak ada protein ataupun lemak. Nilai gizi dari madu sangat tergantung dari kandungan gula – gula sederhana, fruktosa, glukosa, dan sukrosa. Warnanya kuning pucat sampai

coklat kekuningan, rasa dan harumnya madu sangat dipengaruhi oleh jenis nektar yang dikumpulkan dari bunga (Sarwono,2001).

Pengobatan dengan menggunakan madu telah dikenal orang Mesir kuno sejak 2.600 SM. Bangsa Yunani, Romawi, dan Cina kuno sudah menggunakan madu sebagai antiseptik dalam mengobati luka. Walaupun sejak abad ke-19 peranan madu sebagai pemanis telah bergeser oleh kehadiran gula yang terbuat dari bit dan tebu, sampai sekarang madu masih dimanfaatkan dalam beberapa produk pangan sebagai tambahan (Sarwono, 2001).

Pada dasarnya, madu adalah zat manis alami yang dihasilkan lebah dengan bahan baku nektar bunga. Nektar adalah suatu senyawa kompleks yang dihasilkan oleh kelenjar “necterifier” tanaman dalam bentuk larutan gula dengan konsentrasi yang bervariasi. Sukrosa, fruktosa, dan glukosa adalah komponen utama nektar, disamping zat – zat gula lainnya dalam konsentrasi yang lebih sedikit yaitu asam amino, resin, protein, garam, dan mineral. Nektar dikumpulkan lebah pekerja dari bunga dengan cara mengisapnya memakai mulut dan *asaafagus*, lalu masuk ke perut di dalam abdomen. Sebagian nektar diserap oleh dinding perut lebah dan dibuang keluar melalui pipa malfigi dan poros usus. Bersama air dibuang juga asam oksalat dan turunannya, beberapa garam mineral, dan sebagai zat aromatik yang terdapat disekitar nektar. Zat aromatik yang tertinggal memberikan aroma khusus pada madu (Sarwono,2000).

Kualitas madu merupakan pertimbangan yang sangat penting, karena itu sangat perlu diperhatikan bahwa madu harus murni, bersih dari kotoran, misalnya lalat, insekta lain, dan bulu – bulu. Karena itu, adanya pengendalian mutu di

negara/daerah penghasil madu sangat penting khususnya untuk usaha ekspor impor madu ke luar negeri (Sarwono,2000). Kualitas madu ditentukan oleh cara panen madu, jenis madu, komposisi madu, dan kadar air. Baik di alam maupun di peternakan lebah, waktu pemanenan madu harus diperhatikan. Madu yang dipanen harus memiliki kadar air dibawah 22%. Jika sel – sel dalam sarang madu telah ditutup oleh lapisan lilin, madu tersebut telah memenuhi syarat kadar air dan siap untuk dipanen (Sarwono, 2001). Persyaratan kualitas madu berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) nomor 01-3543-2004 dapat dilihat pada **Tabel**

2.1

Tabel 2.1. Persyaratan kualitas madu

No	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
1	Aktifitas enzim diastase, min	DN	3
2	Hidroksimetilfurfural (HMF), maks.	mg/kg	50
3	Air, maks	%b/b	22
4	Gula pereduksi (dihitung sebagai glukosa), min.	%b/b	65
5	Sukrosa, maks.	%b/b	5
6	Keasaman, maks.	mL NaOH 1N/KG	50
7	Padatan yang tak larut dalam air, maks.	%b/b	0,5
8	Abu, maks.	%b/b	0,5
9	Cemaran logam	mg/kg	1,0
	Timbal (Pb), maks.	mg/kg	5,0
	Tembaga (Cu), maks.		
10	Cemaran arsen (As), maks.	mg/kg	0,5

Madu merupakan larutan gula yang jenuh, yang sebagian besar terdiri dari fruktosa (38,5%) dan glukosa (31%). Kandungan fruktosa madu berperan dalam mempercepat proses oksidasi alkohol pada hati, sehingga dapat membantu menanggulangi kerusakan hati pada peminum minuman alkohol. Selain karbohidrat, madu juga mengandung protein, asam amino, enzim, vitamin, dan mineral serta kaya akan kandungan antioksidan seperti vitamin C, flavanonoid dan alkaloid. Setiap jenis madu dari sumber nektar yang berbeda memiliki manfaat dan khasiat yang berbeda pula. Walaupun demikian secara umum khasiat dan manfaat madu tersebut hampir sama. Terdapat 4 faktor yang mendukung madu sebagai prebiotik atau antibakteri: (1) Kadar gula madu yang tinggi mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri, (2) Madu bersifat asam dengan pH sekitar 3-4, dalam kondisi ini bakteri tidak mampu bertahan, (3) Madu mengandung senyawa organik yang bersifat antibakteri antara lain inhibine dari kelompok flavonoid, glikosida dan polyphenol, (4) Madu mengandung senyawa radikal hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dapat membunuh bakteri dan mikroorganisme patogen lainnya. Senyawa tersebut secara reaktif merusak gugus fungsi biomolekul pada sel bakteri. Enzim katalase yang terkandung pada madu akan segera merombak hidrogen peroksida (H_2O_2) yang telah digunakan untuk meracuni bakteri menjadi air dan oksigen (Zulhawa, 2010).

Sumbawa merupakan salah satu daerah penghasil madu terbaik di Indonesia. Terkenalnya khasiat madu Sumbawa disebabkan sumber madu tersebut berasal dari lebah liar yang hanya bisa ditemukan di hutan-hutan Sumbawa. Lebah-lebah madu di Sumbawa tidak ditenakkan melainkan langsung diambil dari hutan-

hutan yang ada di Sumbawa. Makanan lebah yang alami membuat madu Sumbawa berbeda dengan madu daerah lain. Sumbawa terkenal dengan pohon bidara atau dalam bahasa lokalnya *boan* dan dalam bahasa latinnya disebut *Ziziphus mauritiana*. Faktor geografis Sumbawa yang kering dan panas membuat kandungan air yang ada dalam madu Sumbawa menjadi lebih rendah dibandingkan madu daerah lainnya (Zulhawa, 2010).

Madu sering diberi nama sesuai dengan lokasi geografis dimana madu diproduksi, sumber bunga madu atau pohon-pohon dimana sarang ditemukan. Nama Sumbawa identik dengan madu hutan, cairan penjaga kesehatan yang berkhasiat tinggi ini dihasilkan dari belantara rimba. Madu hutan Sumbawa yaitu madu yang berasal dari sejenis pohon lokal yang dalam bahasa setempat dikenal dengan sebutan *boan*, tempat bersarangnya *Apis dorsata* yang menyediakan nektar bagi lebah hutan. Pohon *boan* tersebar di lereng pengunungan dan di lokasi tertentu ditemukan di lembah, sepanjang sungai dan sungai anak atau riparian. Pohon *boan* membentuk lanskap hutan yang menutupi kawasan lindung Kabupaten Sumbawa seluar 45%. Keberadaan lanskap hutan diperlukan untuk menjamin kelangsungan usaha madu hutan bagi penduduk setempat (Maryani dkk., 2013). Madu hutan Sumbawa berasal dari hutan lindung dikategorikan mengikuti topologi tertentu, kelompok hutan ini merupakan penghasil utama madu hutan. Usaha madu hutan yang dikelola melalui suatu jaringan pemasaran melibatkan 265 kepala keluarga yang tersebar di sembilan desa wilayah Kabupaten Sumabawa (Julmansyah, 2010).

Beberapa tahun terakhir, terjadi peningkatan minat dalam menentukan potensi antioksidan dari madu. Mellen *et al.*, (2015) menyatakan bahwa sumber

botani madu memiliki pengaruh terbesar pada aktivitas antioksidannya, sedangkan pengolahan penanganan dan penyimpanan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan madu hanya untuk sebagian kecil. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat adanya ROS dan radikal bebas lainnya sehingga mampu mencegah penyakit degeneratif. Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa tertanggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai (Manyiloh *et al.*, 2011).

Hal ini ditunjukkan dalam beberapa penelitian bahwa potensi antioksidan dari madu berkorelasi dengan konsentrasi total fenolik. Tidak hanya kandungan fenolik saja yang berperan dalam aktifitas antioksidan, madu juga mengandung banyak senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan seperti asam organik, vitamin, katalase, dan glutathion peroksidase (Jamilyadhat, 2013 ; Batrusaitylė *et al.*, 2007). Penelitian lain menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan juga berkorelasi dengan warna madu, madu berwarna gelap memiliki kandungan total fenol yang lebih tinggi sehingga kapasitas antioksidan lebih tinggi (Mellen *et al.*, 2015). Ada lebih dari 150 senyawa fenolik dalam madu, termasuk asam fenolik, flavonoid, flavonol, catechin dan turunan asam sinamat. Komposisi dan kuantitas komponen ini bervariasi sesuai dengan asal bunga dan kondisi geografis (Ferreira *et al.*, 2009).

Madu merupakan pemanis alternatif yang paling aman, yang telah dibuktikan oleh beberapa penelitian dapat menurunkan kadar glukosa darah. Madu mengandung vitamin A, C, E, asam organik, fenol dan flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan serta penangkap radikal bebas (Astarika, 2011). Penelitian lain menyatakan selain senyawa-senyawa tersebut, beta karoten merupakan salah satu senyawa yang berperan sebagai antioksidan yang terkandung dalam madu dan mampu meredam radikal bebas (Parwata *et al.*, 2010).

Zat-zat antioksidan fenolik yang terdapat dalam madu lebih efektif dan dapat menambah perlawanan tubuh terhadap stres oksidatif (Al-'Id, 2010). Pemberian madu diharapkan dapat meningkatkan kadar antioksidan, dan mengakibatkan menurunnya kadar radikal bebas dalam tubuh. Bukti bahwa produk radikal bebas meningkat, salah satunya ditunjukkan oleh kadar *Malondialdehida* (MDA) yang tinggi (Winarsi, 2010). Peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) ini juga mengakibatkan terjadinya peningkatan MDA akibat proses peroksidasi lipid, sehingga MDA digunakan sebagai salah satu marker untuk mengetahui stress oksidatif dalam sel (Shofia *et al.*, 2013).

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah produk samping reaksi fosforilasi oksidatif mitokondria. Pembentukan ROS terjadi saat satu elektron dari molekul O_2 mengalami reduksi yang menghasilkan superoksida (O_2^-) yang selanjutnya diubah menjadi H_2O_2 dengan bantuan enzim superoksida dismutase. ROS dapat merusak unsur-unsur didalam mitokondria, seperti fosfolipid, protein, dan DNA. Akumulasi ROS yang semakin meningkat di dalam sel akan membentuk ikatan dengan asam lemak tak jenuh rantai panjang *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA)

yang memiliki ikatan rangkap dan kemudian menghasilkan radikal lipid peroksida dan produk aldehida (Patrick, 2006).

2.4 Paparan Plumbum (Pb) dan Bahayanya

Timbal atau plumbum (Pb) merupakan salah satu unsur logam berat golongan IVA yang memiliki warna putih kebiruan yang terlihat ketika logam Pb dipotong dan warna ini akan segera berubah menjadi abu-abu gelap ketika terkena udara. Plumbum bersifat lunak dan lentur, tetapi akan rapuh dan mengkerut ketika berada dalam keadaan dingin. Unsur yang mempunyai nomor atom 82, nomor massa 207,2, titik leleh 327 °C dan titik didih 1.620 °C ini, mempunyai sifat sukar larut dalam asam nitrit, asam asetat dan asam sulfat pekat (Palar, 2008).

Paparan Pb dapat berasal dari makanan, minuman, udara, dan lingkungan kerja yang tercemar Pb. Plumbum dan senyawanya masuk ke dalam tubuh manusia melalui saluran pernafasan dan saluran pencernaan, tetapi absorpsi melalui kulit sangat kecil. Bahaya yang ditimbulkan oleh Pb tergantung oleh ukuran partikelnya (Lubis, 2013).

Plumbum yang masuk melalui saluran pernapasan akan diabsorpsi melalui paru-paru sekitar 10-30% dan sekitar 5-10% dari yang tertelan akan diabsorpsi melalui saluran cerna. Sebanyak 30-40% Pb yang diabsorpsi melalui saluran pernapasan akan masuk ke aliran darah (Palar, 2008).

Tikus mempunyai ambang toksik Pb yang didapat secara oral yakni 790 mg/kg dengan paparan kurang dari 14 hari, sedangkan paparan Pb lebih dari 14 hari memiliki ambang dosis toksik 1100 mg/kg. Ambang dosis toksik Pb yang

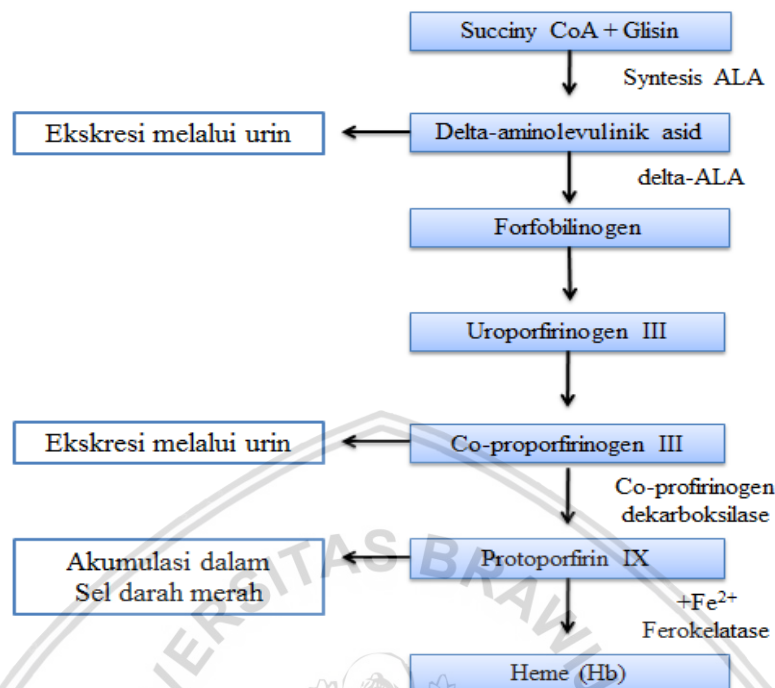
didapat secara inhalasi adalah $10 \text{ mg/m}^3/24 \text{ jam}$, sedangkan ambang dosis toksik yang didapat secara intraperitoneal adalah 1000 mg/kg (Napitupulu, 2008).

Kandungan Pb maksimal yang boleh terbawa dalam bahan makanan yang disyaratkan oleh FAO/WHO dan Ditjen Pengawasan Obat dan Makanan adalah 2 ppm. Logam berat Pb dapat ditoleransi dalam seminggu dengan jumlah 50 mg/kg berat badan untuk dewasa dan 25 mg/kg berat badan untuk anak-anak. Kandungan Pb dalam air sebesar 15 mg/l dianggap sebagai konsentrasi yang aman untuk dikonsumsi. Kadar normal Pb dalam darah adalah $0,003 \text{ mg/100 cc}$. Jika kadar Pb lebih dari $0,10 \text{ mg/100 cc}$ darah, maka dapat menyebabkan keracunan (Sembel, 2015).

Kasus keracunan Pb pada hewan ternak umumnya dilaporkan akibat memakan rumput yang berasal dari sekitar daerah pertambangan atau industri, rumput yang berasal dari sekitar jalan raya atau hewan mengunyah serpihan-serpihan cat tembok, menjilat-jilat kaleng cat, oli motor dan batu baterai bekas. Hewan-hewan tersebut memperlihatkan gejala keracunan Pb yang spesifik. Misalnya, pada sapi dan kuda akan tampak gejala keracunan yang berbeda. Kuda lebih peka dibanding dengan sapi karena hubungannya dengan kebiasaan cara memakan rumput. Kuda mempunyai kebiasaan memakan rumput dengan mencabut rumput disertai dengan akarnya dan tanah yang terkontaminasi oleh polutan Pb akan ikut termakan. Pada burung, akan terjadi ketidakmampuan untuk terbang dan inkoordinasi karena paralisis otot sayap apabila mengalami keracunan plumbum (Sembel, 2015).

2.5 Mekanisme Toksisitas Plumbum Asetat

Logam berat seperti Plumbum (Pb) atau timbal masuk keseluruh tubuh melalui beberapa rute, seperti pernafasan, saluran pencernaan, dan kulit yang kemudian didistribusikan ke berbagai organ. Plumbum asetat yang masuk kedalam gastrointestinal akan diabsorpsi oleh duodenum, kemudian akan berikatan dengan eritrosit (Anonim, 2014). Plumbum yang berikatan dengan darah akan didistribusikan ke jaringan lunak seperti sumsum tulang belakang, sistem saraf, ginjal, dan hati, dan ke jaringan keras seperti tulang, kuku, rambut, dan gigi (Palar, 2008). Ciri khas yang terlihat ketika keracunan plumbum asetat akan nampak *lead line* yaitu perbatasan gigi dan gusi akan nampak pigmen berwarna abu – abu (Goldstein, 1994). Plumbum berikatan dengan eritrosit akan menghambat Na-K-ATP ase, sehingga terjadi kehilangan kalium intraseluler. Selain itu juga menghambat korporasi dari Fe ke protoporfirin IX untuk membentuk Hb. Hal ini terjadi karena delta-ALAD enzim ferroketalase meningkatkan ekskresi koproporfirin dalam urin dan dehta-ALA serta mensintesis Hb (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Pb dalam menghambat produksi Hemoglobin (Darmono, 2001)

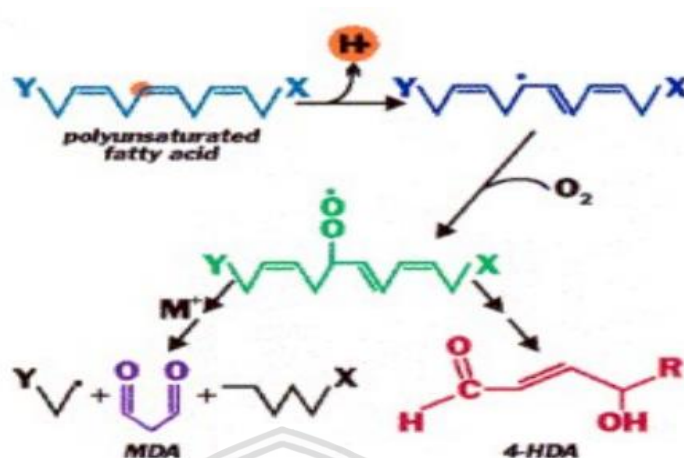
2.6 Malondialdehida (MDA)

MDA merupakan produk peroksidasi lipid yang merupakan aldehid reaktif, dan merupakan spesies elektron reaktif yang menyebabkan stres toksik pada sel dan membentuk produk protein kovalen yang dikenal sebagai sebutan *advance lipoxidation end products* (ALE). Malondialdehida dapat bereaksi dengan deoksiguanosin dan deoksiadenosin pada DNA dan membentuk substansi M1G yang bersifat mutagenik (Szekely *et al.*, 2011).

Radikal bebas bersifat sangat reaktif dan tidak stabil, sehingga sangat sulit mengukurnya secara langsung. Tetapi, terbentuknya peroksida lipid dapat digunakan mendeterminasi secara tidak langsung adanya radikal bebas tersebut. Marker atau produk peroksida lipid, seperti MDA dapat diukur untuk menentukan adanya

radikal bebas (Patil,2008). MDA adalah produk dekomposisi dari PUFA peroksidasi. Analisa Malondialdehida merupakan analisa radikal bebas secara tidak langsung dan merupakan analisa yang cukup mudah untuk menentukan jumlah radikal bebas yang terbentuk. Analisa radikal bebas secara langsung sangat sulit dilakukan, karena radikal – radikal ini sangat tidak stabil dan cenderung untuk merebut elektron senyawa lain agar lebih stabil. Reaksi ini berlangsung sangat cepat sehingga pengukurannya sangat sulit dalam bentuk senyawa radikal bebas (Winarsi,2007). MDA menunjukkan deteksi *free oksigen radical* dalam berbagai macam kondisi patologi (Ozkaya, dkk. 2008).

Mekanisme pembentukan *Malondyaldehyde* (MDA) didalam tubuh melalui proses peroksidasi lipid pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) (Sholichah dkk., 2012). Peningkatan radikal bebas mengakibatkan proses peroksidasi lipid sehingga terjadi peningkatan pembentukan MDA. Mekanisme terjadinya proses peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang oleh gugus radikal hidroksil (OH), sehingga lipid bersifat radikal. Pembentukan radikal lipid tersebut bereaksi dengan atom oksigen (O_2) membentuk radikal peroksil (OO) dan menghasilkan MDA (Agnes dkk., 2013). Mekanisme pembentukan MDA dapat dilihat pada **Gambar 2.4** dibawah ini.

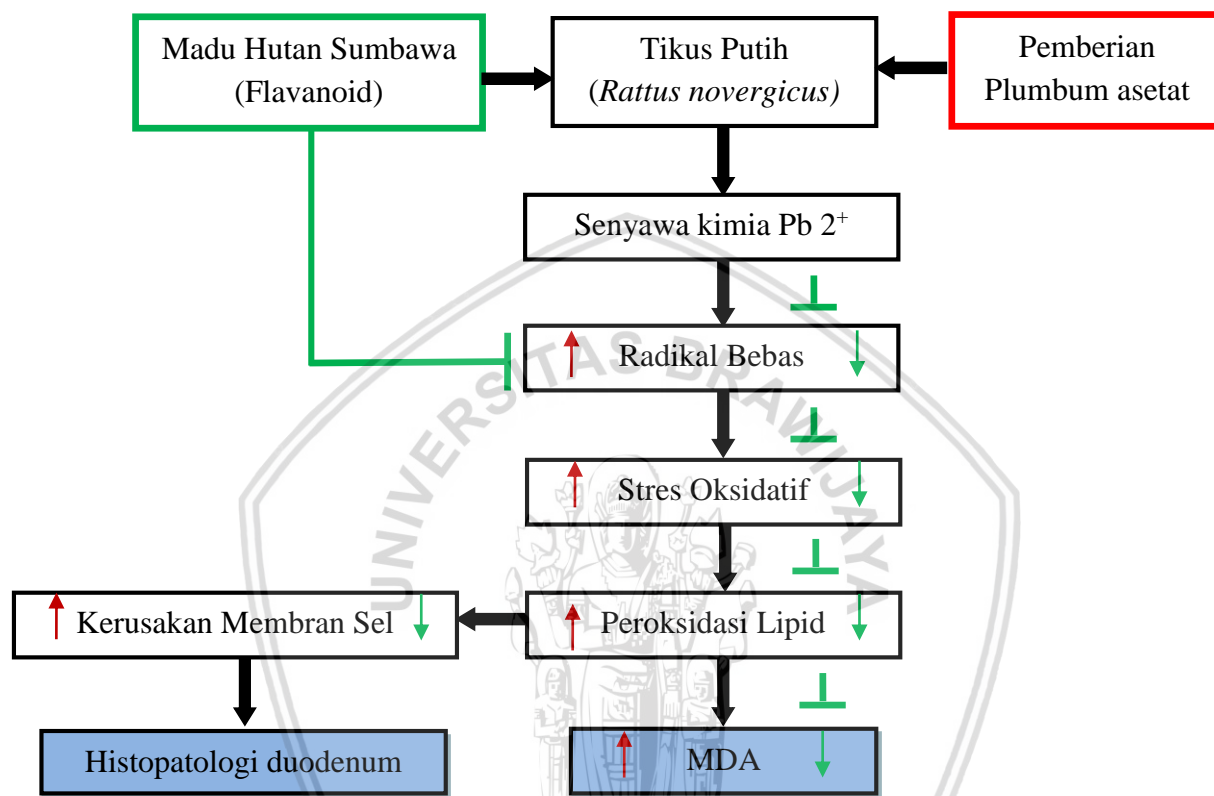


Gambar 2.4. Mekanisme pembentukan MDA (Agnes dkk., 2013)

Hingga saat ini MDA merupakan marker yang paling banyak diteliti, dan dianggap sebagai marker peroksidasi lipid *in vivo* yang baik, pada manusia maupun pada hewan, secara signifikan akurat dan stabil dari pada senyawa lainnya. Kini, MDA telah digunakan secara luas sebagai marker klinis peroksidasi lipid (Niki, dkk. 2009). MDA sangat cocok sebagai biomarker untuk stres oksidatif karena beberapa alasan, yaitu: (1) Pembentukan MDA meningkat sesuai stres oksidatif, (2) Kadarnya dapat diukur secara akurat dengan berbagai metode yang telah tersedia, (3) Bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, (4) Pengukurannya tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal dan tidak dipengaruhi oleh kandungan lemak dalam diet, (5) Merupakan produk spesifik dari peroksida lemak, (6) Terdapat dalam jumlah yang dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis, sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval (Surya, 2012).

BAB 3 KARANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Karangka Konsep Penelitian

Keterangan :

↓ : Mempengaruhi
 ↑ : Peningkatan
 ↓ : Penurunan
 ⊥ : Menghambat

□ : Induksi
 □ : Terapi
 ■ : Variabel terikat
 □ : Hewan coba

Induksi menggunakan plumbum asetat dilakukan secara peroral kepada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*). Plumbum asetat yang diberikan akan masuk melalui mulut (oral) dengan cara sonde lambung. Pb asetat adalah garam organik yang memiliki rumus kimia $Pb(C_2H_3O_2)_2$ akan terhidrolisis apabila terlarut dalam air. Hidrolisis garam merupakan reaksi penguraian garam dalam air membentuk ion positif dan ion negatif. Pb asetat akan terionisasi dalam larutannya menjadi kation yaitu Pb^{2+} dan anion yaitu $C_2H_3O_2^-$. Selanjutnya dari proses hidrolisis menghasilkan senyawa kation Pb^{2+} yang memiliki atom bebas pada lapisan terluar. Pb^{2+} berubah menjadi radikal bebas karena atom yang bebas tersebut berusaha untuk melengkapi lapisan terluar agar lebih stabil dengan mengikat molekul lain dari organ tubuh. Radikal bebas dapat masuk ke dalam pembuluh darah dan merusak endotel. Radikal bebas dalam darah akan berikatan dengan asam lemak tak jenuh berantai panjang *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang memiliki ikatan rangkap sehingga memicu kondisi stres oksidatif serta meningkatkan reaksi peroksidasi lipid pada membran sel. Sifat lipid yang tidak memiliki membran pelindung sebagai komponen membran sel, sensitif terhadap radikal bebas menyebabkan mudahnya terjadi peroksidasi lipid (Winarsi, 2007). Meningkatnya aktivitas radikal bebas menyebabkan kadar MDA (Malondialdehid) semakin tinggi dan dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh.

Radikal bebas juga akan merusak susunan membran sel dalam tubuh yang terdiri dari lipid (*lipid bilayer*). Molekul lipid yang mengalami stres oksidatif akan mengalami auto-oksidasi atau lebih dikenal dengan peroksidasi lipid. Protein yang

mengalami oksidasi menjadi tidak berfungsi dan DNA yang teroksidasi menjadi mutagen, karsinogen atau menyebabkan kematian sel sehingga dapat mempengaruhi fungsi dari sel-sel dan jaringan di usus halus. Dalam gambaran histopatologi, ditandai dengan adanya perubahan struktur duodenum yaitu erosi sel epitel, kerusakan tunika mukosa dan hiperplasia sel goblet serta sel epitel dengan peningkatan vasodilatasi pembuluh darah. Vasodilatasi pembuluh darah memudahkan masuknya sitokin pro-inflamasi ke dalam jaringan duodenum (Baratawidjaya, 2010). Peningkatan jumlah sitokin pro-inflamasi akibat peningkatan radikal bebas mengaktivasi sel radang. Neutrofil merupakan sel radang yang pertama kali keluar pada saat terjadinya inflamasi. Inflamasi dapat ditekan dengan pemberian antioksidan (Elizabeth, 2009; Dambal, *et al.*, 2012).

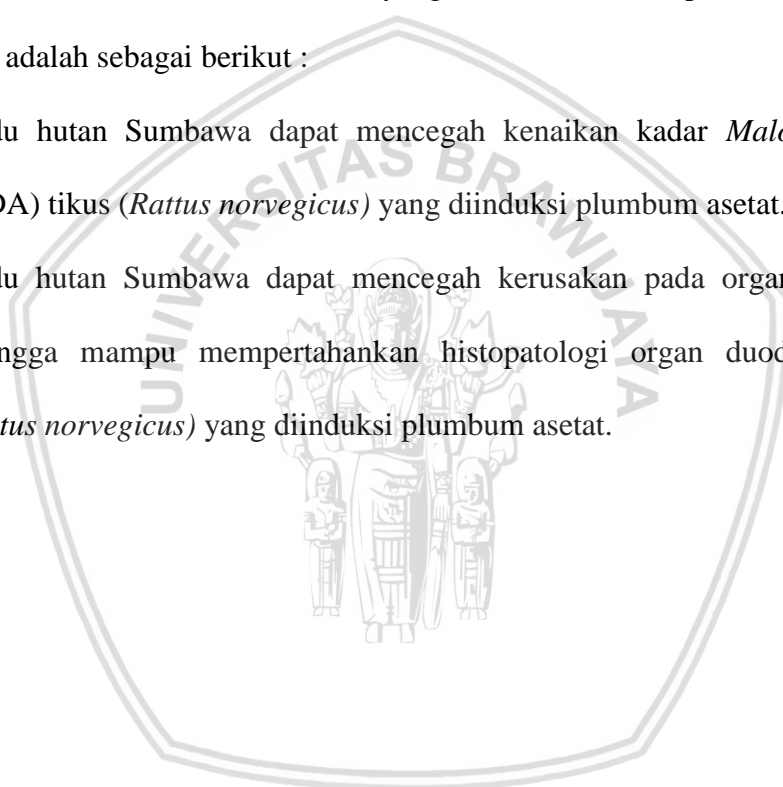
Madu mengandung bermacam-macam zat aktif yang berfungsi sebagai antioksidan (Weirich, 2001) antara lain, vitamin C, asam organik, enzim, asam fenolat, flavonoid dan beta karoten yang bermanfaat sebagai antioksidan tinggi serta vitamin A, vitamin E yang juga merupakan salah satu vitamin antioksidan esensial yang utama (Parwata, 2010). Salah satu senyawa antioksidan pada madu hutan Sumbawa adalah flavonoid. Flavonoid akan bekerja menghambat proses oksidasi melalui penghambatan inisiasi dan propagasi reaksi oksidasi dari radikal bebas. Antioksidan madu hutan Sumbawa akan memberikan atom hidrogen untuk menangkap hidroksil sehingga radikal bebas kurang reaktif. Selain itu, antioksidan dapat menurunkan kondisi stres oksidatif dengan cara menyeimbangkan sistem pertahanan tubuh dengan radikal bebas. Apabila stres oksidatif menurun, maka kerusakan peroksida lipid dan protein juga akan menurun sehingga dapat

menurunkan kerusakan pada sel-sel dan jaringan di usus halus dan menyebabkan kerja usus halus terutama bagian duodenum tetap baik. Pemberian terapi preventif madu hutan Sumbawa diharapkan dapat mencegah penurunan kadar MDA dan mencegah kerusakan gambaran histopatologi usus halus terutama duodenum.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Madu hutan Sumbawa dapat mencegah kenaikan kadar *Malondialdehida* (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum asetat.
2. Madu hutan Sumbawa dapat mencegah kerusakan pada organ duodenum sehingga mampu mempertahankan histopatologi organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum asetat.



BAB 4 METODE PENELITIAN

1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2017 sampai Oktober 2017 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

1.2 Alat dan Bahan Penelitian

1.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan, spuit 1 cc, spuit 3 cc, *microtube*, timbangan digital, gelas ukur, cawan petri, spatula, objek glass, cover glass, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), aluminium foil, tabung polipropilen, *vortex*, *centrifuge* (*Thermoscientific Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge*), *micropipette* ukuran 10-100 μL , mortal, pot organ, *tissue*, kapas, kertas saring, *box* pakan, spektrofotometer, *timer* dan lemari pendingin.

1.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan, pakan tikus standar, Pb asetat (*powder*), madu hutan Sumbawa, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *aquadest*, NaCl fisiologis, *xylol* bertingkat, alkohol bertingkat, PFA 4%, blok parafin, pewarna

Hematoxyline Eosin (HE), standar MDA, alkohol 70%, alkohol 90%, dan alkohol 95%.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dipergunakan apabila media yang digunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Kusriningrum, 2008). Pengukuran parameter kadar MDA dan histopatologi duodenum dilakukan *post test on control group*. Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada **Tabel 4.1**. Secara lengkap skema kelompok perlakuan dan skema kerja penelitian dilihat pada **Lampiran 1**.

Tabel 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati	
		Kadar MDA	Histopatologi Duodenum
1 (Kontrol negatif)	Pakan standar dan air minum		
2 (Kontrol positif)	Pakan standar dan air minum + induksi Pb 10 mg/ekor/hari		
3 (Terapi 1)	Pakan standar dan air minum + 25 mg/kg BB madu hutan Sumbawa + induksi Pb 10 mg/ekor/hari		
4 (Terapi 2)	Pakan standar dan air minum + 50 mg/kg BB madu hutan		

	Sumbawa + induksi Pb 10 mg/ekor/hari
5 (Terapi 3)	Pakan standar dan air minum + 75 mg/kg BB madu hutan Sumbawa + induksi Pb 10 mg/ekor/hari

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Penentuan jumlah sampel minimal menggunakan rumus $p(n - 1) \geq 15$, dimana (p) adalah jumlah perlakuan dan (n) adalah jumlah ulangan (Kusriningrum, 2008), perhitungan banyaknya ulangan sebagai berikut :

$$\begin{array}{rcl}
 p(n - 1) & \geq & 15 \\
 5(n - 1) & \geq & 15 \\
 5n - 5 & \geq & 15 \\
 5n & \geq & 20 \\
 n & \geq & 4
 \end{array}$$

Penelitian ini memiliki lima perlakuan, dengan dasar rumus di atas diperoleh jumlah pengulangan sebanyak lebih dari atau sama dengan empat kali. Jumlah pengulangan yang diambil adalah empat, sehingga sampel yang diperoleh pada penelitian ini sebanyak 20 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).

4.3.3. Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Dosis plumbum (Pb) dan dosis madu hutan Sumbawa
- Variabel terikat : Kadar MDA dan histopatologi duodenum tikus putih
- Variabel kontrol :

- Tikus putih (*Rattus norvegicus*) meliputi jenis kelamin, umur, berat badan, strain Wistar.
- Madu hutan Sumbawa meliputi warna dan konsistensi.
- Pakan.
- Suhu dan lingkungan.

4.4 Karakteristik Sampel Penelitian

4.4.1 Karakteristik Inklusi

- a. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* strain Wistar) umur 8–10 minggu
- b. Berat badan rata-rata 200 gram
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Sehat, ditandai dengan gerak yang aktif dan mata yang jernih

4.4.2 Karakteristik Eksekusi

- a. Tikus yang mati dalam perjalanan penelitian atau mengalami sakit

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dimulai dengan diaklimatisasi hewan coba selama 7 hari di laboratorium. Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan standar sesuai kebutuhan yaitu 20 gram/ekor/hari (10% dari berat badan) dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Hewan coba sebanyak 20 ekor dibagi dalam 5 kelompok perlakuan secara acak. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari masing-masing 4 ekor hewan coba. Tikus dikandangkan sesuai kelompok

perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 26–27°C dengan kelembaban ruang 83% (Andersen *et al.*, 2016).

4.5.2 Penentuan Dosis Madu

Madu yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu hutan Sumbawa yang diperoleh dari hutan produksi di Sumbawa. Madu hutan Sumbawa positif mengandung senyawa flavonoid dan vitamin C sebagai hasil uji kualitatif pada identifikasi flavanoid dan vitamin C yang dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Pada penelitian Al – Yahya *et al.* (2013) telah dilakukan *Acute Toxicity Test* pada tikus untuk mengetahui LD₅₀ melalui peroral. Hasilnya yakni tidak ditemukan gejala toksisitas madu hingga dosis 5 g/kg BB. Pemberian dosis madu yang akan diujikan yaitu masing-masing 25mg/kg BB untuk kelompok C, 50 mg/kg BB untuk kelompok D dan 75 mg/kg BB untuk kelompok E.

Madu yang digunakan mempunyai konsentrasi 1,21 g/mL dan berat tikus yang digunakan adalah rata rata 200 g. Madu hutan Sumbawa diberikan pada hewan coba kelompok 3, 4, 5. Dosis terapi preventif madu kelompok 3 sebesar 25 mg/kg BB, pada kelompok 4 sebesar 50 mg/kg BB, sedangkan kelompok 5 sebesar 75 mg/kg BB yang diberikan 1 mL lalu disondekan ke lambung tikus 1 kali sehari selama 14 hari. Penentuan dosis madu berdasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu pemberian dosis madu baik pada dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 75 mg/kg BB berpotensi menghambat kerusakan sel duodenum dan terbukti bahwa madu mengandung senyawa antioksidan seperti flavonoid, vitamin C, vitamin E, polifenol, dan lainnya dapat menghambat dan mencegah kerusakan duodenum (Kurniadi, 2015). Volume larutan yang disondekan adalah 1 mL tiap

dosis madu yang telah diencerkan dengan aquades. Terapi preventif madu hutan Sumbawa pada kelompok perlakuan C, D, E dilakukan sehari sekali selama dua minggu berturut-turut menggunakan sonde pada **Lampiran 2**.

4.5.3 Pemberian Plumbum Asetat

Plumbum (Pb) yang diberikan adalah plumbum asetat dalam bentukan serbuk berwarna putih yang dilarutkan dengan aquades 1 mL dan diberikan per oral dengan menggunakan sonde lambung. Plumbum asetat diberikan 10 mg/ekor/hari pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 3, perlakuan 4 dan perlakuan 5 selama 2 minggu (14 hari), karena menurut penelitian sebelumnya dengan pemberian plumbum asetat sebanyak 10 mg/hari selama 14 hari dapat menyebabkan peningkatan degenerasi dan nekrosis pada sel hepar (Suprijono dkk., 2011). Pemberian plumbum asetat dan perhitungan dosis secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.5.4 Pengambilan Organ Duodenum Tikus

Pengambilan organ duodenum tikus dilakukan setelah perlakuan 4 minggu selesai dilakukan. Pengambilan organ jejunum dilakukan dengan cara euthanasi melalui dislokasi pada leher tikus, kemudian fiksasi ke empat kaki tikus. Pembedahan dilakukan pada rongga abdomen, dimana tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan bedah. Selanjutnya dilakukan pembedahan abdomen dari arah caudal ke cranial hingga terbuka rongga thorax. Kemudian duodenum diambil dan dipotong menggunakan gunting bedah yang sebelumnya dibilas dengan aquades, kemudian duodenum dipotong menjadi 2 bagian yaitu bagian pertama disimpan dalam PBS-azida pH 7,4 untuk pengukuran kadar MDA

menggunakan uji *Thioarbituric Acid Reactive Substance* (TBARSC), sedangkan bagian kedua disimpan dalam larutan *Paraformaldehida* 4% untuk pembuatan preparat histopatologi menggunakan pewarnaan HE.

4.5.5 Pengukuran Kadar *Malondialdehida* (MDA)

Standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/ml masing-masing diambil 100 μ L, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, setelah itu ditambahkan 550 μ L aquades. Setiap tabung tersebut ditambahkan 100 μ L TCA 100%, 250 μ L HCl 1N dan 100 μ L Na-Thio 1%, dan campuran yang terbentuk dihomogenkan dengan *vortex*. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Tabung diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 20 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum (530 nm) menggunakan spektrofotometer (Shimadzu *UV-visible spectrophotometer* UV-1601). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin dkk., 2009) pada **Lampiran 5**.

Kadar MDA dianalisis menggunakan metode uji *Thioarbituric Acid Reactive Substance* (TBARSC) dengan spektrofotometri. Prinsip metode ini berdasarkan kepada kemampuan pembentukan kompleks berwarna merah jambu antara MDA dan asam thiobarbiturat (TBA) dengan prosedur sebagai berikut : sebanyak 0,5 g duodenum ditimbang bersama pasir kuarsa digerus dengan mortas hingga halus. Kemudian ditambahkan 200 μ L NaCl fisiologis ke dalam mortar dan berbentuk homogenat dimasukkan ke dalam tabung propilen dan ditambahkan 550 μ L aquades. Larutan tersebut ditambah 100 μ L TCA dan dihomogenkan kemudian

ditambah 250 μL HCl 1N dan dihomogenkan kembali. Campuran ditambah 100 μL Na-Thio 1 % dan dihomogenkan selanjutnya diinkubasi dalam waterbath 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang dan disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang telah dipanaskan selanjutnya didinginkan pada temperatur ruang. Setelah itu ditentukan nilai absorpsi sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Agnes, dkk., 2013).

4.5.6 Histopatologi Duodenum

4.5.6.1 Pembuatan Preparat dan Perwarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE)

Histopatologi Duodenum

Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, deparafinasi, rehidrasi, perwarnaan, dehidrasi, *clearing* dan *mounting* (Junquiera and Carneiro, 2005). Tahapan pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu merendam organ duodenum dalam PFA 4% selama 24 jam. Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai (Jusuf, 2009).

Tahap selanjutnya adalah dehidrasi, dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya adalah tahap penjernihan organ (*clearing*) dilakukan dengan mulai pemindahan jaringan ke

larutan penjernihan yaitu xylol I (1 jam), xylol II dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

Selanjutnya adalah *embedding*, dimana organ dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56 °C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan pemblokkan dengan parafin blok yang berukuran sesuai dengan tempat blok *microtome*. *Embedding* berfungsi agar organ lebih padat. Blok tersebut dipasang pada *microtome* dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong (*sectioning*) dengan ketebalan 5 µm dan direndam pada *water bath* dengan suhu 38–40 °C. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang dipotong masih belum sempurna. Kemudian irisan yang didapat diletakkan pada *object glass*. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37-38 °C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati dkk., 2013).

Tahapan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dimulai dengan tahapan deparafinasi yaitu dengan memasukkan preparat ke dalam xylol bertingkat I–III masing-masing selama 5 menit. Tujuan adalah untuk menghilangkan/melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Selanjutnya, dilakukan tahapan rehidrasi, dimana preparat dimasukkan dalam alkohol, mulai dari alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit, lalu direndam dalam aquades selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan perwarnaan preparat yang dimasukkan dalam pewarna *hematoxyline* selama 10 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna pada inti sel atau nukleus. Kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit, dibilas dengan aquades dan dimasukkan ke dalam pewarna *eosin* selama 5 menit.

Tujuannya adalah untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Selanjutnya, preparat direndam dalam aquades untuk menghilangkan pewarna *eosin* yang masih menempel.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90% dan 95% yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan. Selanjutnya, dilakukan *clearing* dengan memasukkan preparat pada xylol I–III dan dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan *mounting* dengan menggunakan entellan (Jusuf, 2009). Pembuatan preparat dan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) secara lengkap dijelaskan pada **Lampiran 4**.

4.5.6.2 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi duodenum dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* 4 lapang pandang dengan perbesaran 400x. Pengamatan histopatologi duodenum yang diamati adalah lapisan mukosa dengan tanda-tanda terjadinya inflamasi seperti infiltrasi sel radang, nekrosis, hemorhagi, erosi sel epitel, hiperplasia sel goblet dan hiperplasia sel epitel.

4.6 Analisa Data

Data penelitian kadar *Malondialdehida* (MDA) yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam *one way ANOVA* menggunakan *software SPSS (Statistical Package for Social Sciences)* 23,0. Dan dilakukan uji lanjutan BNJ $\alpha = 5\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan, sedangkan gambaran histopatologi dianalisis deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum Asetat Terhadap Kadar *Malondialdehida* (MDA) Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengukuran kadar MDA menggunakan uji *Thioarbituric Acid Reactive Substance* (TBARSC) bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa dalam menurunkan kadar MDA organ duodenum pada tikus (*Rattus norvegicus*). Hasil yang didapat bahwa terapi preventif madu hutan Sumbawa pada tikus menunjukkan penurunan kadar MDA dan memberikan hasil yang signifikan ($P < 0,05$). Hasil pengukuran kadar MDA dapat dilihat pada **Tabel 5.1 dan Lampiran 9. iii**

Tabel 5.1 Hasil pengukuran peningkatan dan penurunan kadar MDA

Kelompok	Rata-rata kadar MDA $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan dibanding kontrol negatif	Penurunan dibanding kontrol positif
Kontrol negatif	$0,636 \pm 0,012^a$	-	71,2%
Kontrol positif	$2,212 \pm 0,048^c$	121,2%	-
P1 25 mg/kg BB	$1,136 \pm 0,016^b$	-	48,6%
P2 50 mg/kg BB	$0,891 \pm 0,021^{ab}$	-	59,7%
P3 75 mg/kg BB	$0,694 \pm 0,008^{ab}$	-	68,6%

Keterangan :

- Notasi (a, b, dan c) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan dengan nilai ($p < 0,05$).

Berdasarkan **Tabel 5.1** diketahui hasil analisa statistik menunjukkan bahwa penggunaan madu hutan Sumbawa dapat mempengaruhi kadar MDA jaringan. Dari hasil analisa *one way* ANOVA menunjukkan bahwa madu hutan

Sumbawa mampu menurunkan kadar MDA hewan tikus yang diinduksi plumbum aasetat pada dosis 25 mg/Kg BB, 50 mg/Kg BB, dan 75 mg/Kg BB menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan kontrol positif. Kadar MDA menunjukkan bahwa terjadi penurunan pada kontrol negatif (hewan sehat) dengan nilai kadar MDA $0,636 \mu\text{g/mL} \pm 0,012$ jika dibandingkan dengan kontrol positif (hewan sakit) dengan kadar MDA $2,212 \mu\text{g/mL} \pm 0,048$ sebesar 71,2%. Kadar MDA pada kontrol negatif (tikus sehat) merupakan kadar MDA yang dapat direspon tikus normal, oleh karena itu digunakan sebagai pembanding untuk menentukan adanya penurunan atau peningkatan radikal bebas yang terjadi pada perlakuan. Penurunan MDA dapat digunakan sebagai indikator perbaikan kerusakan jaringan (Mudassir, 2012).

Kadar MDA pada kelompok perlakuan kontrol negatif mengalami sedikit peningkatan radikal bebas. Radikal bebas (*free radical*) atau sering disebut *reactive oxygen species* (ROS) adalah bagian dari radikal bebas yang merupakan produk dari metabolisme sel normal dan berada di dalam tubuh. Radikal bebas merupakan salah satu produk reaksi kimia dalam tubuh berupa atom atau gugus yang mempunyai elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya, sehingga senyawa ini bersifat sangat reaktif (tidak stabil). Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya proses peroksidasi lipid dengan produk akhir MDA (Yustika *et al*, 2013). Umumnya radikal bebas diperlukan bagi kelangsungan beberapa proses fisiologis dalam tubuh, terutama untuk transportasi elektron. Radikal bebas dalam kadar normal dibutuhkan untuk perkembangan sel dan juga membantu sel darah putih atau leukosit untuk menghancurkan atau memakan benda asing masuk ke dalam

tubuh. Oleh karena itu radikal bebas juga berperan dalam metabolisme tubuh pada keadaan normal. Salah satu penyebab adanya malondialdehyde pada kontrol negatif adalah secara alami radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh atau sering disebut dengan radikal bebas endogen; antara lain (1) Autoksidasi yaitu produk dari proses metabolisme aerob yang dapat menghasilkan kelompok oksigen reaktif, (2) Oksidasi enzimatik, yaitu terdapat beberapa enzim yang dapat menghasilkan radikal bebas seperti: *xanthine oksidase*, *lipoxigenase*, dan *amino acid oxidase*, (3) *Respiratory burst*, adalah proses sel fagositik menggunakan oksigen dalam jumlah besar dalam proses fagositosis, penggunaan oksigen berperan dalam produksi superoksida yang merupakan bentukan awal dari radikal bebas (Sirait, 2016). Menurut Widayati (2012) mengatakan bahwa apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan endogen, mengarahkan sel kepada keadaan *stress oxidative*, jika produksi ROS seimbang dengan kapasitas antioksidan endogen, mengarahkan sel pada pertumbuhan.

Kelompok perlakuan kontrol positif yaitu hewan tikus yang diinduksi plumbum asetat 10 mg/Kg BB mengalami peningkatan persentase kadar MDA sebesar 121,2% jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif. Peningkatan kadar MDA pada kelompok tikus kontrol positif (hewan sakit) dikarenakan Pb akan masuk ke dalam organ pencernaan melalui kanal Ca^{2+} dan meningkatkan influk Ca^{2+} , sehingga terjadi akumulasi pada sitoplasma (Wahyuningsih, 2008). Akumulasi Ca^{2+} yang banyak di sitoplasma akan mengganggu aktivitas dari mitokondria, sehingga rantai respirasi menjadi terganggu dan memicu terjadinya radikal bebas. Peningkatan radikal bebas dapat

menyebabkan kerusakan membran sel dan menyebabkan kondisi stres oksidatif. Hal ini terjadi karena jumlah radikal bebas dengan antioksidan intrasel tidak seimbang dan memicu terjadinya peroksidasi lipid dan dihasilkan produk akhir berupa *malondialdehida* (MDA).

Mekanisme reaksi peroksidasi lipid diawali pada tahap inisiasi yaitu pengambilan atom H dari asam lemak tak jenuh oleh oksigen bebas yang terdapat pada OH \cdot . Stabilitas bentuk dari produk awal ini ditentukan oleh energi disosiasi ikatan antara C-H. Ikatan ganda metilen pada asam lemak tak jenuh lebih mudah teroksidasi dari pada ikatan pada asam lemak jenuh. Selanjutnya, reaksi antara radikal pentadienil dengan atom O $_2$ pada tahap propagasi akan menghasilkan reaksi yang menginisiasi asam lemak tak jenuh lainnya sehingga menghasilkan produk radikal bebas yang baru. Reaksi ini akan terus menerus menjadi reaksi berantai hingga dihasilkan metabolit sekunder yang salah satunya adalah malondialdehyde (MDA) yang digunakan sebagai marker terjadinya peroksidasi lipid (Mudassir, 2012).

Berdasarkan penelitian Kamilatussaniah (2015) menyatakan bahwa masuknya plumbum asetat ke dalam tubuh pada kadar tertentu dapat menyebabkan terjadinya perubahan pada beberapa molekul tubuh sehingga pada akhirnya fungsi tubuh akan terganggu. Organ yang mengalami gangguan fungsi tubuh salah satunya adalah duodenum. Duodenum merupakan salah satu bagian dari usus halus yang terletak paling anterior dan berfungsi sebagai tempat penyerapan sari-sari makanan (Raditya *et al*, 2013). Sari-sari makanan akan diedarkan oleh sistem peredaran darah untuk disebarkan ke seluruh tubuh. Adanya kerusakan duodenum yang

disebabkan oleh plumbum asetat dapat menginduksi pembentukan radikal bebas serta menurunkan aktivitas dan produksi antioksidan endogen dengan demikian akan terjadinya stres oksidatif.

Pemberian terapi preventif madu hutan Sumbawa pada tikus perlakuan 1 dengan dosis 25 mg/Kg BB menunjukkan penurunan kadar MDA sebesar $1,136 \mu\text{g/mL} \pm 0,016$ yang cukup signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol positif sebesar $2,212 \mu\text{g/mL} \pm 0,048$. Jika dibandingkan persentase penurunan kadar MDA dengan kontrol positif, penurunan pada kelompok perlakuan 1 yaitu sebesar 48,6%. Dosis 25 mg/Kg BB dapat menurunkan kadar MDA. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratama (2016), bahwa dosis 25 mg/kg BB mampu menurunkan kadar MDA jika dibandingkan kelompok kontrol positif. Pemberian terapi preventif madu hutan Sumbawa pada tikus perlakuan 2 dengan dosis 50 mg/Kg BB dan tikus perlakuan 3 dengan dosis 75 mg/Kg BB mampu mencegah kenaikan kadar MDA dan memperbaiki fungsi duodenum. Pada hewan coba kelompok perlakuan 2 dengan dosis 50 mg/Kg BB menunjukkan penurunan kadar MDA sebesar $0,891 \mu\text{g/mL} \pm 0,021$ mendekati kelompok kontrol negatif dengan persentase sebesar 58,7% sedangkan pada hewan coba kelompok perlakuan 3 dengan dosis 75 mg/Kg BB mampu menurunkan kadar MDA sebesar $0,694 \mu\text{g/mL} \pm 0,008$ dengan persentase yaitu sebesar 68,6% (**Lampiran 9**). Kelompok perlakuan 2 (dosis madu hutan Sumbawa 50 mg/kg BB) dan kelompok perlakuan 3 (dosis madu hutan Sumbawa 75 mg/kg BB) memiliki perbedaan nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif.

Penelitian ini menggunakan terapi preventif madu hutan Sumbawa pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan plumbum asetat. Terapi madu hutan Sumbawa terbukti mampu mencegah peningkatan kadar MDA, hal ini juga diperkuat dengan dari hasil gambaran hidtopatologi duodenum pada **Gambar 5.2**. Kelompok perlakuan terapi preventif (dosis 25 mg/Kg BB, 50 mg/Kg BB, 75 mg/Kg BB) memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap pencegahan kenaikan kadar MDA. Kelompok terapi preventif 1,2,3 memiliki presentase untuk mencegah kenaikan kadar MDA masing–masing sebesar 48,6%, 59,7% dan 68,6% yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif yang tidak diberikan terapi preventif madu hutan Sumbawa. Berdasarkan uji Tukey, kelompok terapi preventif dengan dosis terbaik ditunjukkan pada kelompok perlakuan 3 dengan pemberian dosis 75 mg/Kg BB yang tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif. Hasil analisa statistik menunjukkan kelompok perlakuan 3 mampu menurunkan kadar MDA sebesar $0,694 \mu\text{g/mL} \pm 0,008$ dan kelompok perlakuan kontrol negatif sebesar $0,636 \mu\text{g/mL} \pm 0,012$, hal ini menunjukkan bahwa pemberian madu hutan Sumbawa dosis 75 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam mencegah kenaikan kadar MDA hingga mendekati kondisi normal (kontrol negatif) dengan melihat nilai rata–rata kadar MDA yang hampir sama dengan kelompok kontrol negatif.

Pencegahan kenaikan kadar MDA pada kelompok perlakuan terapi preventif 1, 2, dan 3 dibandingkan dengan tikus kontrol positif (hewan sakit) disebabkan karena madu hutan Sumbawa mengandung senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil uji fitokimia secara kualitatif **Lampiran 7**, madu hutan Sumbawa memiliki kandungan flavonoid. Kandungan flavonoid tersebut berfungsi sebagai

antioksidan endogen yang berperan dalam peningkatan radikal bebas untuk dinetralkan dan menghambat reaksi peroksidasi lipid.

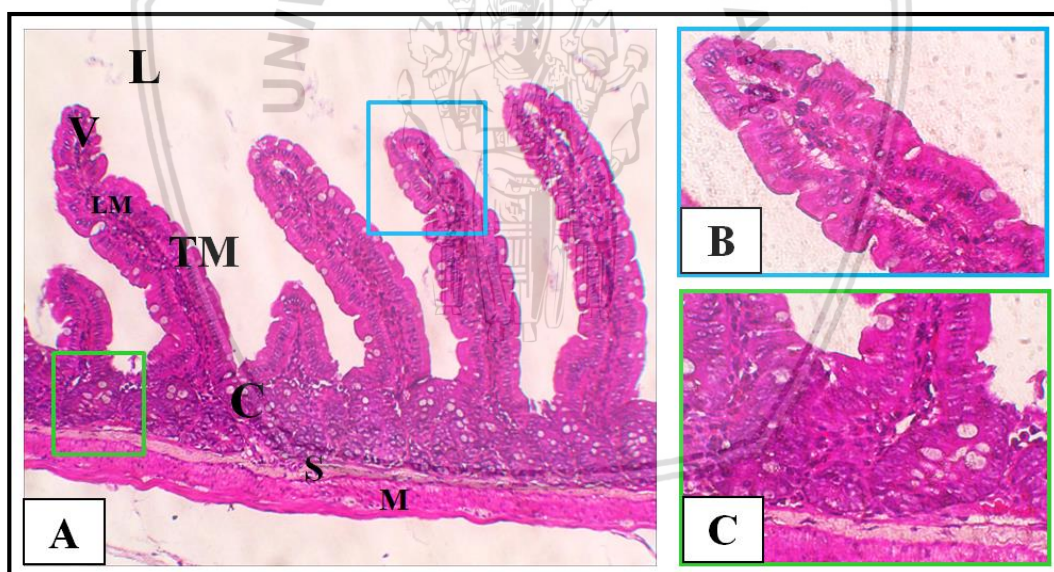
Mekanisme kerja dari flavonoid yang terkandung dalam madu hutan Sumbawa yakni dengan menghambat peroksidasi lipid akibat radikal bebas. Menurut Rahma (2012), flavonoid mampu mendonasikan atom hidrogen (H^+) dari gugus hidroksil (OH^-) kepada radikal bebas (R^*) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO^*). Radikal fenoksil flavonoid yang pertama terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R^*) sehingga membentuk radikal fenoksil yang kedua (FIO^*). Radikal fenoksil flavonoid memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat menyeimbangkan strukturnya dengan cara delokalisasi elektron sehingga menghilangkan efek radikal bebas (Pratama, 2016). Efek radikal bebas yang hilang akan diikuti dengan penurunan stres oksidatif dalam tubuh yang berpengaruh pada kadar *malondialdehid* (MDA) yang dihasilkan dari peroksidasi lipid (Kurniadi, 2015). Hal ini diperkuat oleh penelitian Jamilyadhaty (2013), bahwa madu hutan Sumbawa memiliki aktivitas antioksidan terbaik karena macam kandungan flavonoid yang mampu meredakan radikal bebas dibandingkan madu budidaya.

Pemberian plumbum asetat pada penelitian ini akan meningkatkan kadar radikal bebas di dalam tubuh sehingga terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan endogen yang menyebabkan stres oksidatif. Oleh karena itu memerlukan antioksidan eksogen untuk menetralkan kadar radikal bebas di dalam diantaranya menggunakan terapi preventif madu hutan Sumbawa.

Penggunaan terapi preventif madu hutan Sumbawa dosis 75 mg/kg BB menunjukkan penghambatan kenaikan kadar MDA paling tinggi dan mendekati kadar MDA kontrol negatif (hewan sehat), sehingga penggunaan terapi preventif madu hutan Sumbawa dosis 75 mg/kg BB merupakan pemberian dosis terbaik dalam penelitian ini.

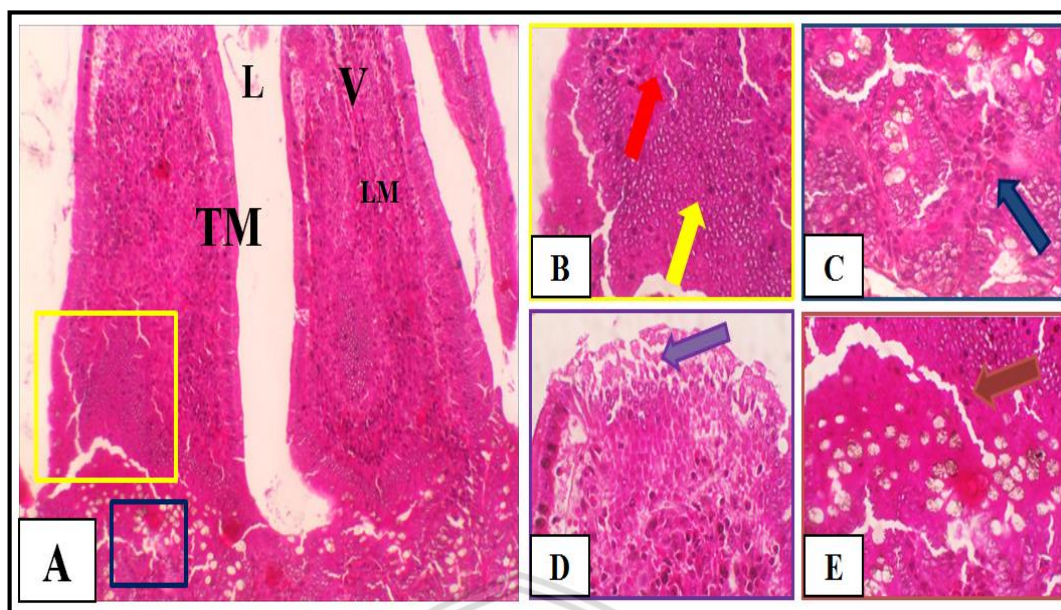
5.2 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum Asetat Terhadap Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*)

Berikut ini adalah hasil pengamatan histopatologi duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*).



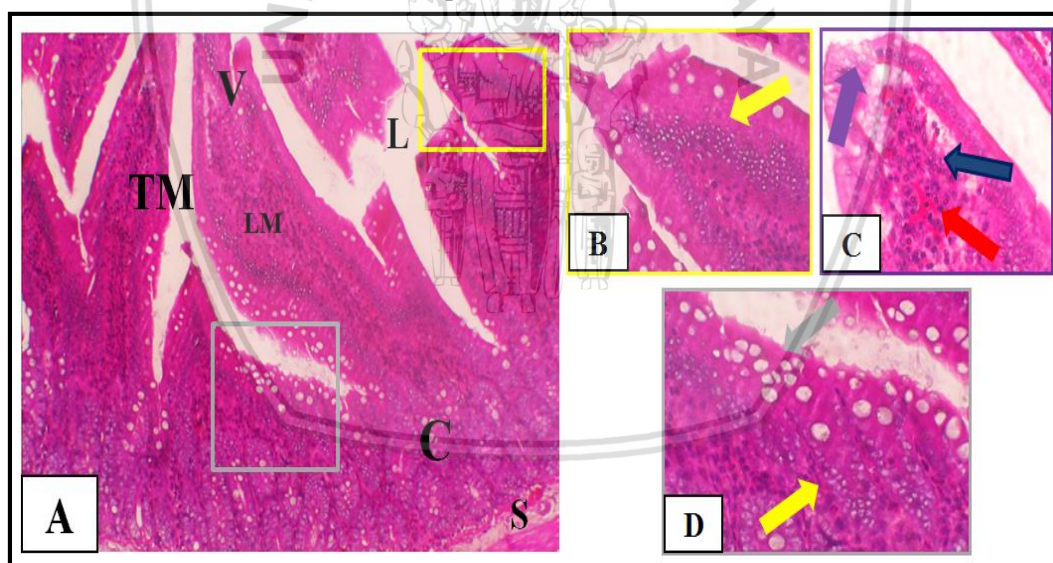
Gambar 5.2.1 Histopatologi duodenum tikus kontrol negatif dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) Sel epitel normal (kotak biru) dan (C) tunika mukosa tidak mengalami kerusakan (kotak hijau).

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif; (L) Lumen; (TM) Tunika Mukosa; (V) Vili; (LM) Lamina Propria; (S) Submukosa; (M) Muskularis dan (C) Crypt.



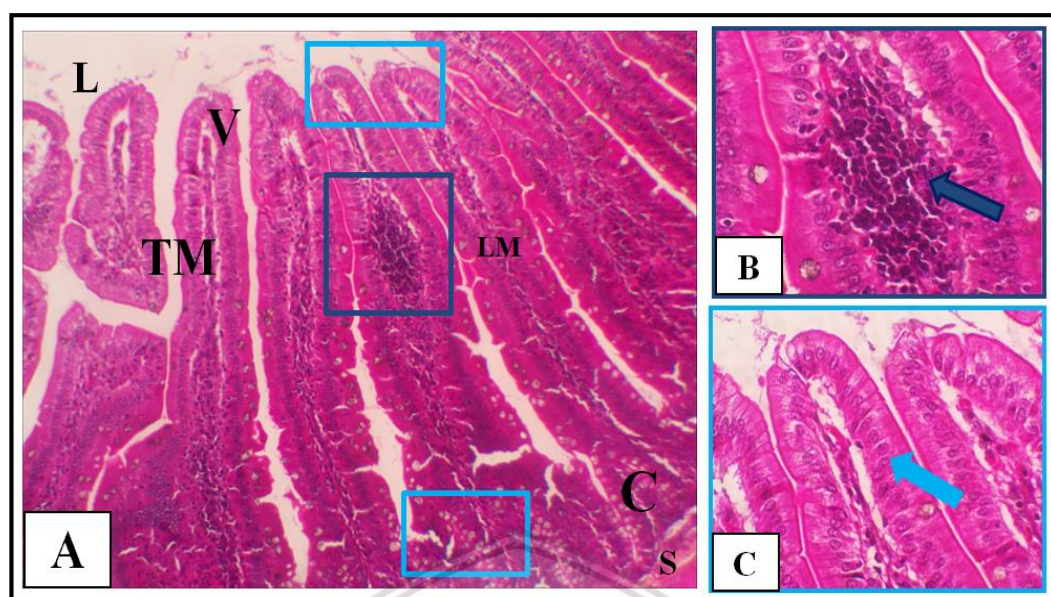
Gambar 5.2.2 Histopatologi duodenum tikus kontrol positif dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C,D,E). (B) Hiperplasia sel epitel (kotak kuning); (C) sel radang (kotak biru tua); (D) erosi sel epitel (kotak ungu); (E) nekrosis liquefaktif.

Keterangan : (A) Tikus kontrol positif. Hemorhagi (panah merah); hiperplasia sel epitel (panah kuning); sel radang (panah biru tua); erosi sel epitel (panah ungu); nekrosis liquefaktif (panah coklat). (L) Lumen; (TM) Tunika Mukosa; (V) Vili; (LM) Lamina Propria.



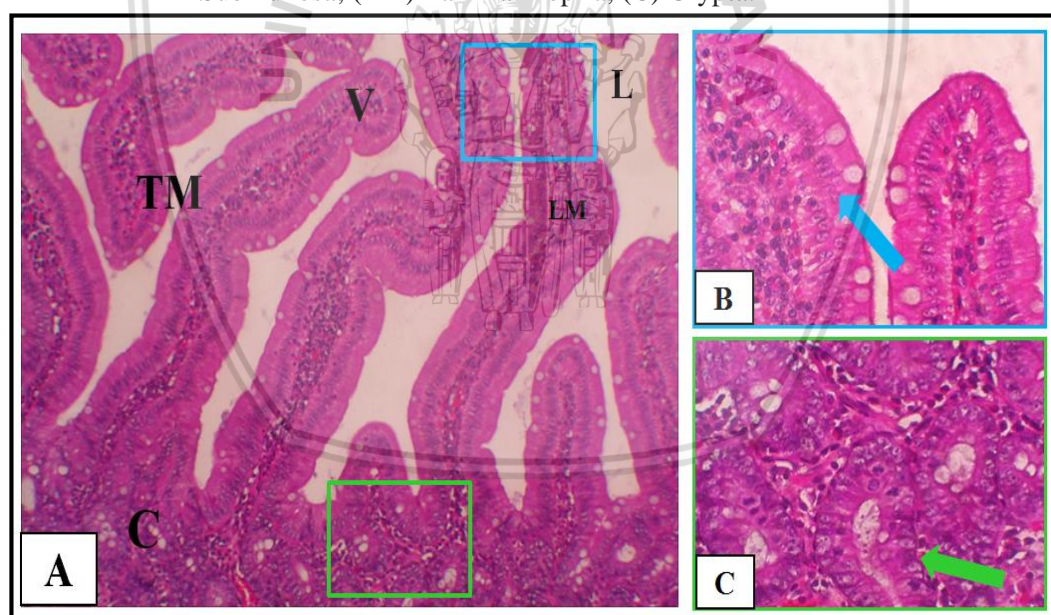
Gambar 5.2.3 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 25 mg/Kg BB dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C,D). (B) Hiperplasia sel epitel (kotak kuning); (C) hemorhagi, sel radang, erosi sel epitel (kotak ungu); (D) Hiperplasia sel goblet dan sel epitel (kotak abu-abu).

Keterangan : (C) Tikus terapi preventif 1 ; Hiperplasia sel epitel (panah kuning); sel radang (panah biru tua); erosi sel epitel (panah ungu); hemorhagi (panah merah); hiperplasia sel goblet (panah abu-abu) (L) Lumen; (TM) Tunika Mukosa; (V) Vili; (S) Submukosa; (LM) Lamina Propria; (C) Crypt.



Gambar 5.2.4 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 50 mg/Kg BB dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) sel radang (kotak biru tua); (C) sel epitel normal.

Keterangan : (D) Tikus terapi preventif 2; sel radang (panah biru tua); sel epitel normal (panah biru muda). (L) Lumen; (TM) Tunika Mukosa; (V) Vili; (S) Submukosa; (LM) Lamina Propria; (C) Crypta.



Gambar 5.2.5 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 75 mg/Kg BB dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) sel epitel normal (kotak biru muda); (C) tunika mukosa normal.

Keterangan : (D) Tikus terapi preventif 3; sel epitel normal (panah biru); tunika mukosa normal (panah hijau). (L) Lumen; (TM) Tunika Mukosa; (V) Vili; (LM) Lamina Propria ; (C) Crypt.

Hematoxyline Eosine (HE) menggunakan perbesaran 100x dan 400x dengan mengamati struktur vili, sel epitel, infiltrasi sel radang, dan sel goblet pada **Gambar 5.2**. Secara normal, duodenum terdiri dari empat lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis dan tunika serosa. Struktur lapisan tunika mukosa dan submukosa terdiri atas vili yang tersusun oleh sel – sel epitel silindris sebaris, adanya kelenjar brunner yang berupa sel epitel kuboid padat dan sel goblet dalam kondisi normal karena tidak ada aktivitas berlebih dalam memproduksi mukus (Eroschenko, 2008).

Berdasarkan pada **Gambar 5.2.1** dapat dilihat bahwa kelompok kontrol negatif (tikus sehat) menunjukkan gambaran histologi duodenum tikus sehat yang tanpa diberi perlakuan induksi plumbum asetat. Duodenum memiliki struktur vili panjang dan rapat (mukosa dalam keadaan baik). Histologi mukosa dan submukosa duodenum terlihat pada kelompok kontrol negatif yaitu terlihat lapisan epitelial terdapat sel epitel kolumner simplek dan sel goblet yang berada disela – sela epitel tertata rapi menunjukkan kontinuitas sel mukosa duodenum yang sehat dan pada bagian submukosa terdapat kelenjar duodenal berbentuk tubuler dan tidak ditemui adanya infiltrasi sel radang. Vili duodenum memiliki struktur dan bentuk yang normal.

Pada kelompok kontrol positif (tikus sakit) berdasarkan **Gambar 5.2.2** tikus yang diberi perlakuan dengan induksi plumbum asetat menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif (tikus sehat). Dari hasil pengamatan kontrol positif dapat diketahui adanya erosi sel epitel, sel radang, nekrosis liquefaktif, hiperplasia sel goblet dan sel epitel serta adanya hemorhagi.

Kerusakan pada lapisan mukosa yaitu vili mengalami pembesaran dari ukuran normal (tidak dalam kondisi baik) serta terlihat sel inflamasi pada lapisan mukosa dan submukosa duodenum. Vili berfungsi untuk memperluas permukaan penyerapan, sehingga proses absorpsi dapat menyerap nutrisi berjalan dengan baik (Abdullah, 2007). Kerusakan struktur vili terjadi karena erosi dari sel epitel yaitu hilangnya sebagian sel epitel karena rusak sehingga lapisan epitel dan sel goblet tidak lagi tertata secara lengkap rapat dan rapi yang disebut dengan diskontinuitas epitel. Hal ini terjadi karena plumbum asetat yang masuk ke kanal Ca^{2+} dapat meningkatkan influk Ca^{2+} di sel epitel duodenum, sehingga terjadi akumulasi plumbum asetat di sitoplasma. Hal ini menyebabkan aktivitas mitokondria terganggu dan memicu radikal bebas. Peningkatan radikal bebas akan memicu munculnya peroksidasi lipid dan terjadinya kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik yang diawali dengan hilangnya potensial membran mitokondria yang dapat melepaskan cytochrome c ke cytosol (Murphy, 2009). Menurut Dambal (2012), munculnya peroksidasi lipid dapat mempengaruhi fluiditas, struktur dan fungsi dari membran sel.

Plumbum asetat dapat menyebabkan terjadinya peradangan karena plumbum secara tidak langsung dapat memicu perubahan permeabilitas ketika terjadi inflamasi. Plumbum asetat yang masuk akan dikenali sebagai antigen asing. Sifat plumbum yang lipofilik akan menyebabkan plumbum cepat bereaksi dengan lipid bilayer pada permukaan sel sehingga mengalami kerusakan. Sel rusak akan menginduksi terjadinya peradangan (Adikara, 2013). Sel radang yang dalam proses inflamasi pada kejadian ini diantaranya neutrofil, limfosit dan makrofag dimana

yang mendominasi adalah sel neutrofil. Jumlah sel radang yang meningkat dikarenakan pada fase awal proses inflamasi, sel yang pertama kali tertarik ke darah yaitu neutrofil (Laine, 2002). Menurut Fournier (2012), neutrofil bertanggung jawab dalam proses penarikan sel radang lainnya untuk melokalisir terjadinya kerusakan dengan melepaskan mediator inflamasi seperti $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\gamma$ dan $IL-6$. Neutrofil selanjutnya akan memfagositosis sel debris dan membunuh bakteri, selain itu neutrofil juga akan mengeluarkan protease untuk memecah jaringan rusak. Neutrofil yang sudah tua kemudian akan mengalami kematian sel dan didegradasi oleh makrofag. Pengamatan kelompok ini terlihat adanya perbaikan pada lapisan mukosa dimana berkurangnya vili yang mengalami patah –patah dan adanya hemorhagi walaupun kriptas usus masih mengalami kerusakan seperti pada kelompok kontrol positif (hewan sakit). Menurut Ogata (2008) perbaikan lapisan mukosa duodenum yang ditandai dengan perbaikan sel epitel mukosa duodenum.

Akumulasi rangsangan sel–sel inflamatori seperti neutrofil yang memicu peradangan akut akan menimbulkan adanya nekrosis liquefaktif. Kerusakan penyusun membran sel seperti lipid dan protein, akan menyebabkan membran sel mengalami kerusakan dan permeabilitas sel menjadi terganggu. Keadaan ini akan menyebabkan air dan cairan yang lain dapat dengan mudah masuk ke dalam sel, sel akan mengalami pembengkakan (*swelling*) yang hebat dan berakhir dengan kematian sel (nekrosis). Ciri khas dari nekrosis liquefaktif ditandai oleh larutnya jaringan akibat lisis enzimatis sel–sel yang mati serta jaringan yang mengalami liquefaksi menjadi lunak, mudah mencair, dan tersusun oleh sel–sel yang mengalami disintegrasi cairan (Alvarez, 2010).

Menurut McGavin (2007), hemorhagi atau perdarahan adalah suatu kondisi keluarnya darah dari pembuluh darah akibat kerusakan dinding endotel. Hemorhagi dapat terjadi melalui robekan (reksis) atau melalui regangan akibat berubahnya permeabilitas endotel. Oleh karena itu hemorhagi yang diakibatkan oleh induksi plumbum asetat dapat terjadi karena adanya reaksi inflamasi yang menyebabkan vasodilatasi endotel, sehingga eritrosit dapat ikut keluar dari pembuluh darah.

Hyperplasia yaitu peningkatan jumlah sel dalam organ atau jaringan (Hayashi, 2012). Sel goblet berfungsi untuk mensintesis dan mensekresikan mukus glikoprotein berbentuk gel untuk melindungi sel-sel epitelium intestinal dari mikroorganisme dan bahan toksik lainnya. Plumbum asetat merupakan benda asing yang dapat memicu respon imunitas dengan peningkatan sel T helper 2 (Th-2) yang menggerakkan pelepasan sitokin terutama interleukin (IL-3, IL-4 dan IL-5) untuk melepaskan mediator peradangan yang akan merekrut sel neutrofil dan eosinofil, aktivasi sitokin yang dilepaskan oleh sel T akan merangsang proliferasi dan hiperplasia sel goblet (Balqis, 2011). Hiperplasia ditandai adanya rangsangan oleh senyawa toksik menyebabkan respon kompensasi dari mukosa usus halus untuk melindungi mukosa dengan cara memperbanyak sel goblet dari normal sebagai bentuk pertahanan duodenum dari zat toksik. Hiperplasia terjadi hanya pada jaringan yang mampu melakukan pembelahan sel dan terjadi pada berbagai jaringan dalam berbagai maupun bersifat fisiologis. Hiperplasia sel epitel terjadi pada usus halus tikus pasca pemberian fraksi Asam Amino Non-Protein dan fraksi polifenol *Acacia villosa* yaitu dengan adanya penebalan mukosa akibat bertambahnya sel

epitel vili (Wuragil,2007). Adanya rangsangan oleh senyawa toksik yaitu plumbum astatat menyebabkan respon kompensasi dari mukosa usus halus untuk melindungi mukosa dengan cara memperbanyak sel epitel. Penebalan epitel terjadi karena respon dari proses perbaikan sel, sel – sel epitel dan subepitel mengekspresikan IL-11 yang berkorelasi dengan deposisi luas kolagen tipe I dan III. Selain itu juga terjadi peningkatan regulasi dan hipersekresi mucin MUC (MUC5B lebih dari tipe MUC2) (Barlianto *et al*, 2009).

Berdasarkan histopatologi duodenum terapi preventif pemberian madu dengan dosis 25 mg/Kg BB, 50 mg/Kg BB, dan 75 mg/Kg BB menunjukkan perbedaan yang nyata dalam memberikan pengaruh perbaikan lapisan duodenum terutama lapisan mukosa dan submukosa. Histopatologi duodenum kelompok tikus yang diberi perlakuan pemberian madu hutan Sumbawa dengan dosis 25 mg/Kg BB

Gambar 5.2.3 menunjukkan jaringan sel epitel yang masih rusak, adanya hiperplasia sel goblet dan sel epitel, infiltrasi sel radang, serta adanya hemorragi. Hiperplasia sel goblet dan sel epitel menyebabkan adanya penebalan epitel sehingga ukuran vili terlihat membesar. Histopatologi duodenum kelompok tikus perlakuan pemberian madu hutan Sumbawa dosis 50 mg/Kg BB **Gambar 5.2.4** menunjukkan adanya perbaikan vili yang mengecil dan struktur sel epitel yang baik, kriptus usus sel epitel telah terlihat rapat dan rapi (menunjukkan kondisi yang baik). Lapisan submukosa pada terapi preventif kelompok ini mengalami perbaikan yang nyata, terlihat mengalami perbaikan bentuk kelenjar duodenal sudah jelas berbentuk tubuler yang cukup optimal jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan ini masih ditemui adanya sel radang.

Histopatologi perlakuan kelompok madu hutan Sumbawa dosis 75 mg/Kg BB pada **Gambar 5.2.5**, terlihat memiliki kesamaan dengan kontrol negatif (hewan sehat) pada **Gambar 5.2.1**, dimana menunjukkan adanya perbaikan tunika mukosa yang paling baik. Perlakuan dengan dosis 75 mg/kg BB menunjukkan perbaikan yang berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol positif (hewan sakit) pada **Gambar 5.2.2**. Kelompok terapi preventif madu hutan Sumbawa dosis 75 mg/Kg BB memberikan perbaikan pada histopatologi duodenum paling optimal yang ditandai dengan sel – sel epitel yang utuh dan terlihat kompak serta tertata rapi terlihat kontinuitas sel epitel pada lamina propria mukosa duodenum dan lapisan submukosa duodenum seperti gambaran histopatologi tikus kontrol negatif (hewan sakit).

Pemberian madu hutan Sumbawa sebagai terapi preventif bertujuan untuk mencegah terbentuknya radikal bebas dalam tubuh ketika tikus yang diinduksi plumbum asetat sehingga diharapkan peningkatan kadar *malondialdehid* (MDA) dan kerusakan organ duodenum dapat dicegah. Berdasarkan hasil uji fitokimia secara kualitatif madu hutan Sumbawa mengandung antioksidan yaitu flavonoid dan vitamin C (**Lampiran 7**) yang menyebabkan radikal bebas menjadi kurang reaktif.

Madu mengandung senyawa – senyawa organik yang bersifat antibakteri. Selain mengandung senyawa antibakteri. Madu hutan juga memiliki potensi mengandung senyawa antioksidan. Kandungan madu antara lain vitamin C, asam organik, enzim, asam fenolik, flavonoid, dan beta karoten yang bermanfaat sebagai antioksidan tinggi dan memiliki aktivitas antioksidan (Jamiyadhatus, 2013). Salah

satu metabolit sekunder yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah flavonoid. Flavonoid dapat berlaku sebagai antioksidan karena sifatnya sebagai akseptor yang baik terhadap radikal bebas. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas dan mencegah terbentuknya peroksidasi lipid (Sathiskumar *et al*, 2009).

Kandungan lain yang terdapat pada madu hutan Sumbawa adalah vitamin C. Vitamin C merupakan antioksidan yang memiliki efek antiinflamasi. Menurut Sugihartini *et all* (2017) mengatakan bahwa vitamin C memiliki aktivitas sebagai anti-inflamasi. Vitamin C merupakan salah satu vitamin larut air dan penting pada proses metabolisme. Manfaat vitamin C anantara lain sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan meningkatkan sistem imun. Antiinflamasi vitamin C dengan menghambat aktivasi faktor transkripsi *nuclear factor kappa* (NF- κ B) dan menghambat terjadinya peroksidasi lipid (Anitra, 2013). Vitamin C meningkatkan dan memperkuat sistem imun dengan merangsang aktivitas antibodi dan sel imun fagosit dan neutrofil (Cavalcante, 2009). Menurut Arifuddin (2016) dalam penelitiannya membuktikan bahwa vitamin C menunjukkan adanya perbaikan kerusakan struktural jaringan menuju struktur normal pada tikus yang terpapar plumbum asetat.

Penelitian ini menggunakan madu hutan Sumbawa berfungsi sebagai antioksidan yang mencegah dan memperbaiki kerusakan sel akibat radikal bebas. Antioksidan membantu tunika mukosa untuk menunjang kerja organ duodenum dalam melakukan penyerapan nutrisi makanan yang masuk melalui proses enzimatik secara normal. Pada pengamatan histopatologi duodenum tikus yang

diberikan terapi preventif madu hutan Sumbawa menunjukkan perbaikan gambaran yang paling optimal yaitu terapi madu hutan Sumbawa dengan pemberian dosis 75 mg/Kg BB.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi madu hutan Sumbawa dosis 25 mg/Kg BB, 50 mg/Kg BB, dan 75 mg/Kg BB menurunkan kadar MDA duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap induksi plumbum asetat, dengan dosis terbaik adalah 75 mg/Kg BB sebesar 68,6%.
2. Pemberian terapi madu hutan Sumbawa memperbaiki histopatologi duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan dosis terbaik yaitu 75 mg/Kg BB.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis madu hutan Sumbawa yang optimal untuk terapi tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap induksi plumbum asetat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, E. M, Saktiyono dan Lutfi. 2007. *IPA Terpadu SMP dan MTs Jilid 2A*. Erlangga.
- Andersen M.L., D’Almeida V., Ko G.M., Martins P.J.F., dan Tufik S. 2016. *Care and Maintenance of Laboratory Animals*. In: Andersen M., Tufik S. (eds) *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. Springer, Cham.
- Adikara, A. P, Ida, B. O, dan I Wayang, S. 2013. *Studi Histopatologi Hati Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang diberi Ekstrak Etanol Daun Kedondong (Spondias dulcis G.Forst) Secara Oral*. Buletin Veteriner Udayana Vol 5: 2.
- Adiyanti, P. N. 2011. *Ragam jenis ektoparasit pada hewan coba tikus putih (Ratus norvegicus) galur Sprague dawley*. Skripsi. Bogor : Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Agnes, R. Y., Aulanni’am dan P. Sasangka. 2013. *Kadar Melondialdehid (MDA) dan Gambaran Histologi Pada Ginjal Tikus Putih (Rattus novergicus) Pasca Induksi Cylosporine-A.1*. *Kimia Student Journal*. (2) : 222-228.
- Al-‘Id, M. S. 2010. *Pengobatan dengan Madu Cetakan 1*. Pustaka Al-Kautsar. Jakarta Timur. 3: 15-17.
- Al-Yahya, Mohammed., Ramzi, Mothana., and Mansour, Al-Said. 2013. *Attenuation of CCl₄-Induced Oxidative Stress and Hepatonephrotoxicity by Saudi Sidr Honey in Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 569037. Doi:10.1155/2013/569037.
- Alvarez, A., Lacalle. J., Canavate., Alconada- Alonso., Celador Lara.,and Hilario. 2010. *Cell death. A comprehensive approximation. Necrosis. Microscopy: Science, Technology, Application and Education Journal*.Spain.
- Amin, M.H.F., A.P.W. Marhendra, dan Aulanni’am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas pada Tikus Asma. Paper Presentasi pada Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang*. 437-447.
- Anitra, C C., and Margreet C M. 2013. *Synthetic or food derived vitamin C are they equally bioavailable? Nutrients*. 2013:5:4284-304.
- Anonim. 2014. *Occupational Safety & Health Administration*. <https://www.osgha.gov/SLTC/lead/> [Diakses 24 September 2017].

- AOEC (Association of Occupational Environmental Clinics), 2010. *Medical Management Guidelines for Lead-Exposed Adult*. Washington DC.
- Ardyanto, D. 2009. *Deteksi Pencemaran Timah Hitam (Pb) dalam Darah Masyarakat yang Terpajan Timbal (Plumbum)*. *Jurnal Kesehatan Lingkungan* 1 (2) ; 67-76.
- Astarika, A. G. 2011. *Pengaruh Pemberian Madu terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Diabetes*. Skripsi UNISSULA. 50-58.
- Bacha, W. J. J. and L. M. Bacha. 2012. *Color Atlas of Veterinary Histology*. 3rd Ed. Lippincott Williams dan Winkins. Philadelphia. 356 pages.
- Balqis, U., Darmawi dan M. Hambal. 2011. *Respon Sel Goblet terhadap Penyakit Parasitik pada Ayam Petelur yang Diberikan Ekskretori/Sekretori Stadium L₃ Ascaridia galli*. *Veterinary Journal* hal: 26-28.
- Baltrusaitylė, V., Venskutonis, P.R. and Ceksterytė, V. 2007. Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Beebread Phenolic Extracts. *Food Chemistry*. 101 : 502-514.
- Baratawidjaja, G.K., dan I. Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar*. Jakarta :Balai Penerbit FKUI. Halaman 529-530.
- Barlianto, W., Kusuma, Moh S C., Karyono., dan Mintaroem K. 2009. *Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin*. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.
- Bures, J., J. Pejchal., J. Kvetina., A. Tichy., S Rejchrt., M. Kunes and M. Kopacova. 2011. *Morphometric Analysis Of The Porcine Gastrointestinal Tract In A 10-Day High-Dose Indomethacine Administration with Or without Probiotic Bacteria Escherichia Coli Nissle 1917*. *Journal Sagepub Human and Experimental Toxicology* 30(12) 1955-1962.
- Cavalcante AG, and Brian PF. 2009. *The Role of Oxidative stress in Copd:current concept and perspectives*. *Journal Brassilian Pneumology*. 2009;35(12):1227-37.
- Dambal, S.S and S. Kumari. 2012. *Evaluation of Lipid Peroxidation and Total Antioxidant Status in Human Obesity*. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences* 2(3) : 62 – 68.
- Darmono. 2001. *Lingkungan Hidup dan Pencemaran*. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Devianty, K G. 2016. *Terapi Preventif Ekstrak Etanol Daun Beluntas (Pluchea indica less) terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Diinduksi*

dengan *Plumbum (Pb)*. [Skripsi]. Program Studi Kedokteran Hewan. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.

Elizabeth, J. C. 2009. *Buku Satu Patofisiologi Corwin*. Jakarta : Aditya Media.

Eroschenko, V. P. 2008 . *Di Fiore's Atlas Histology with Functional Correlations-11 th edition*. Lippincott Williams & Wilkins.

Fenga, C., Cacciola, A., Martino, L.B., Calderaro, S.R., Di Nola, C., Verzera, A., Trimarchi, G., and Gemano, D. 2006. *Relationship of Blood Lead Levels to Blood Pressure in Exhaust Battery Storage Workers*. *Industrial Health* 44 : 304-309.

Ferreira, I.C.F.R., Aries, E., Barreira, J.C.M., and Estevinho, L.M., 2009. *Antioxidant Activity of Portuguese Honey Samples: Different Contributions of The Entire Honey and Phenolic Extract*. *Food Chem*, 114 : 1438-1443.

Fournier, B. M and C. A Parkos. 2012. *The Role of Neutrophils During Intestinal Inflammation. Epthelial Pathobiology Research Unit, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Giorgia: USA*. 5, 354-336; doi:10.1038/mi .2012.24.

Goldstein BD and HM Kipen . 1994. *Hematologic Disorde*. In Levy and Wegman (eds) : *Occupational Healt Recognizing and Preveting Work-Realted Disease*. 3rd ed. United Stated of Amerika : Liltle Brown And Company.

Hammer, GD and Stephen J.Mc Phee. 2014. *Pathophysiology of Disease an Introduction to Clinical Medicine*. McGraw-Hill Education Europe. New York, United States.

Hayashi, T. 2012. *Molecular Mechanisms of Metaplasia, Differentiation and Hyperplasia of Goblet Cellin Allergic Asthma*. *Allergy and Therapy Journal*. 3:3.

Hearn, W.L., and H. C. Walls. 2007. *Introducing to postmortem toxicology*. In : *Postmortem toxicology of abused drug*. Karch SB, editors. Boca Raton (US): CRP ; 2007. P: 1-11.

Jamilyadhatus, S. 2013. *Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Tiga Jenis Madu Hutan Indonesia*. [Skripsi]. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Jannah, AI. 2017. *Pengaruh Induksi Plumbum Asetat terhadap Memori Kerja Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus L) galur sprague dawley*. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. Bandar Lampung. [Skripsi].

Johnson, M. 2012. *Laboratory Mice and Rats*. Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States.

- Julmansyah. 2010. *Madu Hutan Menekan Deforestasi. Jalan Lain Konservasi DAS dan Adaptasi Perubahan Iklim*. Jaringan Madu Hutan Sumbawa (JMHS). Pondok Madu Rakyat Desa Batudulang, Kecamatan Batulanteh.
- Junqueira, L. C., and Jose C. 2005. *Basic Histology Text & Atlas. Female Reproductive System. 11th Ed*. United States of America: Mc Graw Hill.
- Junqueira, L. C., and Mescher, Anthony. 2013. *Basic Histology Text & Atlas. Digestive Trac. 13th Ed*. United States of America: Mc Graw Hill.
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Kamilatussaniah., A, Yuniastuti., R, dan S Iswari. 2015. *Pengaruh Suplementasi Madu Kelengkeng terhadap kadar TSA dan MDA tikus putih yang diinduksi timbal (Pb)*. *Jurnal MIPA* 38 (2) (2015): 108-114.
- Kurniadi, R,Y.2015. *Pengaruh Pemberian Madu sebagai Terapi Preventif terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Histopatologi Duodenum pada Tikus (Rattus norvegicus) yang di Induksi CCL4*. [Skripsi]. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kusriningrum R. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lubis B, Rosdiana N,Nafianti S, Rasyianti O, dan Panjaitan FM. 2013. *Hubungan Keracunan Timbal dengan Anemia Defisiensi Besi pada Anak*.CDK-200 40(1).
- Manyiloh, CE, Anna M. C and Roland N.Ndip. 2011. *An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health*. *African Journal of Microbiology Research*. 5(8) pp 844-852.
- Maryani, R., Alviya, I., Budiarifanti, V dan Salmiah, M. 2013. *Melestarikan Lanskap Hutan Sumbawa melalui Penguatan Kelompok Tani Madu Hutan*. Laporan Internal Proyek PKPP, Kerjasama Kemen RISTEK bersama Kementerian Kehutanan dan Pemerintah Kabupaten Sumbawa. Sumbawa Besar. Vol 7 : 13.
- McGavin, MD., and Zachary, JF. *Phatologic Basis of Veterinary Disease, 4th Edition*. *Can Vet Journal*. 48(7): 724.
- Mellen M, Martina F, Andrea M, and Peter H. 2015. *Antioxidant Effect of Natural Honeys Affected by their Source and Origin*. *Polish Journal Food Nutrition Scienties*. 65(2) pp 81-85.
- Metelev, V.V., Kanaev, A.I., & Dzasokhova, N.G. 1983. *Water Toxicology*. *Amerid Publishing Co.PVT.Ltd*. New Delhi, India. Pp 93-94.

- Mudassir, A.Aziz, dan A.Q Punagi. 2012. *Analisis Kadar Malondialdehid (MDA) Plasma Penderita Polip Hidung Berdasarkan Dominasi Sel Inflamasi pada pemeriksaan Histopatologi*. Makassar: Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.
- Murphy, M. P. 2009. *How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. Review Article. Biochem. J*; 417: 1-13.
- Napitupulu, R.R.J. 2008. *Pengaruh Pemberian Kalsium Secara Oral Terhadap Kadar Plumbum Dalam Darah Mencit (Mus musculus L)*. Medan: USU Repository.
- Niki, E. 2009. *Lipid Peroxidation: Physiological Levels and Dual Biological Effects*. Free Radical Biology & Medicine: 47 :469-484.
- Ogata T. 2008. *Duodenal and Gastric Cell Regeneration Epthelia On Margins Of Human Duodenal Ulcer And Presence Of H. Pylori – An Electron Microscopic Study. Journal Histology and Histopathology*. 2008;12 57-68.
- Olaibi, K.O., Ijomone, M.O, and Adewole, S.O. 2014. *Histological and Histomorphometric Studies of Ethanol-Injured Pylorus and Duodenum of Wistar rats pre treated with Moringa oliefera extract. J Med Sci*; 7(2):104-111.
- Ozkaya O, Mekin S, and Hakan K. 2008. *Serum Malondialdehyde, Erythrocyte Glutation Peroxidase, and Erythrocyte Superoxide Dismutase Levels in Woman With Early Spontaneous Abortion Accompanied by Vaginal Bleeding. Med Sci Monit* : Vol.14(1): 47-51.
- Palar, H. 2008. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Rineka Cipta: Jakarta.
- Palupi, H. N., Aulanni'am, dan D. K. Wuragil. 2013. *Studi Terapi Air Perasan Labu Siam (Sechium edule) pada Tikus (Rattus norvegicus) model Inflammatory Bowel Disease Pasca Induksi Indometasin terhadap kadar Malondialdehida dan Gambaran Histopatologi Duodenum*. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Parwata, I. M., K. Ratnayani dan A. Listia. 2010. *Aktivitas antiradical bebas serta kadar beta karoten pada madu kapuk (Cieba pentandara) dan madu kelengkeng (Nephelium longata L.)*. J. Kimia 4 (1) : 54-62.
- Patil, S. B, Kodliwadmth M. V, and Sheela M. K. 2007. *Correlation Between Lipid Peroxidation and Non-enzymatic Antioxidant in Pregnancy Induced Hypertensio*. Indian Journal of Clinical Biochemistry: 23 (1): 45-48.
- Patrick, L. 2006. *Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. Alternative Medicine Review*. 11(2) : 114-127.

- Pratama, A. Y. 2016. *Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Riau terhadap Kadar MDA dan Kadar ALP pada Serum Hewan Model Tikus yang Diinduksi CCL₄*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Raditya., I. G, Ida., B. K, dan Suastika., P. 2013. *Tebal Struktur Histologis Duodenum Ayam Pedaging yang Diberi Kombinasi Tylosin dan Gentamicin*. Jurnal Indonesia Medicus Veterinus. ISSN: 2301-7848.
- Rahardjani dan K.Budi. 2010. *Hubungan antara Malondialdehyde (MDA) dengan Hasil Luaran Sepsis Neonatorum*. Jurnal Sari Pediatri, 12(2): 82-87.
- Rahma, N. I. 2012. *Potency of Sargassum duplicatum Bory Extrac on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus*. Journal of Life Sciences 6. Pp 144-154.
- Sarwono, B. 2001. *Kiat Mengatasi Permasalahan Praktis Lebah Madu*. Cetakan Pertama. PT. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Sarwono, B. 2000. *Lebah Madu (ed Revisi)*. Agro Media.
- Sathiskumar., Sampath M., Sivachandran S. V., Shanmugam S and Rajasekaran P. 2009. *Optimal Process for The Extraction and Identification of Flavonoid from the leaves of Polyalthia longifolia using L₆ Orthogonal design of Experiment*. Internatioinal J. Biol Chem Sci 3(4): 736-745.
- Sembel DT. 2015. *Toksikologi Lingkungan*. Penerbit Andi: Yogyakarta.
- Sharma, B, Singh S, and Siddiqi NJ. 2014. *Biomedical Implications of heavy metals induced imbalances in redox systems*. BioMed research international. 2014 (4): 1-26.
- Sharp P, and Villano J. 2013. *The Laboratory Rat*. Second edition. CRC Press: Boca Raton
- Shofia, V., Aulanni'am, dan C. Mahdi. 2013. *Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (Sargassum prismaticum) terhadap Kadar Malondialdehid dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjal pada Tikus (Rattus novergicus) Diabetes Melitus Tipe I*. Kimia Student Journal. 1(1) : 119-125.
- Sholichah, N. A., Aulanni'am dan C. Mahdi. 2012. *Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (Lannea coromandelica) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (Rattus novergicus) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Akibat Paparan Indometasin*. Veterinarian medika. 5(3) : 187-194.
- Sirait, R.C., DK Tjahjono K dan Setyawati, A.N. 2016. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (Nigella sativa) terhadap Kadar MDA Serum tikus*

Sparague Dawley Setelah Diberikan Paparan Asap Rokok. Jurnal Kedokteran Diponegoro. Vol 5 No 4: 1603-1612.

Sugihartini, N., Saridevi, R., Ramdhani, M., Rahmawanti, F., Yuliani, S., Sophia, V. 2017. Anti- Inflammatory Activity of *Camellia sinensis*, L. *Extract Cream Combined with Vitamin C as Antioxidant on Croton Oil-induced Inflammation in Male Mice Strain BALB/C. Journal Trad Med. Vol 22(2), p 73-79.*

Suksmerri, 2008. *Dampak Pencemaran Logam Timah Hitam (Pb) terhadap Kesehatan. Jurnal Kesehatan Masyarakat II.*

Suprijono, A. Chodidjah, dan S. Banun. 2011. *Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) Per Oral Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar. Jurnal Majalah Ilmiah Sultan Agung. Volume 49 Nomor 123. Semarang.*

Suranto. 2007. *Terapi Madu. Penebar Plus. Jakarta.*

Surya, I . G. P. 2012. *Kadar Malondialdehid yang Tinggi Meningkatkan Risiko Terjadinya Preeklampsia. RSUP Sanglah Denpasar. Bali.*

Suyanto, A, Sri Kusmiyati dan Ch. Retnaningsih. 2010. *Residu Logam Berat dalam Daging Sapi yang Dipelihara Tempat Pembuangan Sampah Akhir. Jurnal Pangan dan Gizi Volume 01 No 01.*

Szekely, J., Wang, H., Peplowski, M., G. Knutson., Marnett, L.J and Rizzo, C.J. 2011. *“ONE-POT” Syntheses of Malondialdehyde Adducts of Nucleosides. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids Journal NIH Public Access. 27(2): 103-109.*

Triyanti, 2011. *Penilaian Status Gizi. Departemen Gizi dan Kesehatan Masyarakat. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Indonesia. Rajawali Press: Jakarta.*

Wahyuningsih, Cicilia Tyasti. 2008. *Pengaruh ekstrak Etanol Daun Kelapa Pohon (Manihot utilisima Pohl.) setelah pemberian Na₂CaEDTA terhadap Kadar Timbal Darah Tikus dengan Metode Spektroskopi Serapan Atom. Universitas Sanata Dharma [Skripsi].*

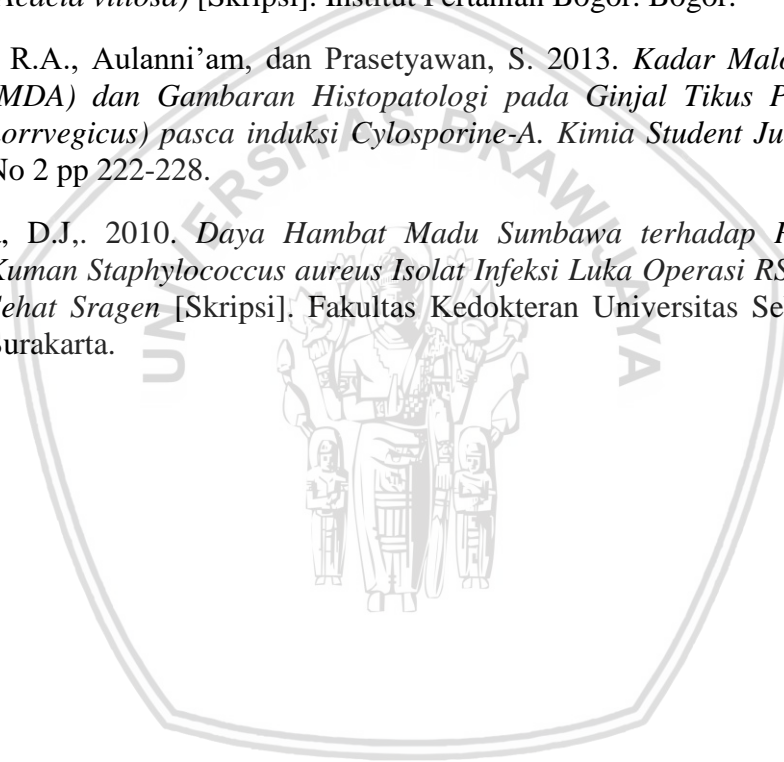
Wati, I. P., Aulanni'am, dan C. Mahdi. 2013. *Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine .A. Kimia Student Journal. 1(2) : 258.*

Weirich,G.F.,A.M Collins., and V, P Williams. 2009. *Antioxidant enzymes in the honey bee, Apis mellifera. Bee research laboratory. USA.*

Widayati, E. 2012. *Oxidasi Biologi, Radikal Bebas dan Antioksidant. Journal Majalah Ilmiah Sultan Agung. Sultan Agung Islamic University.*

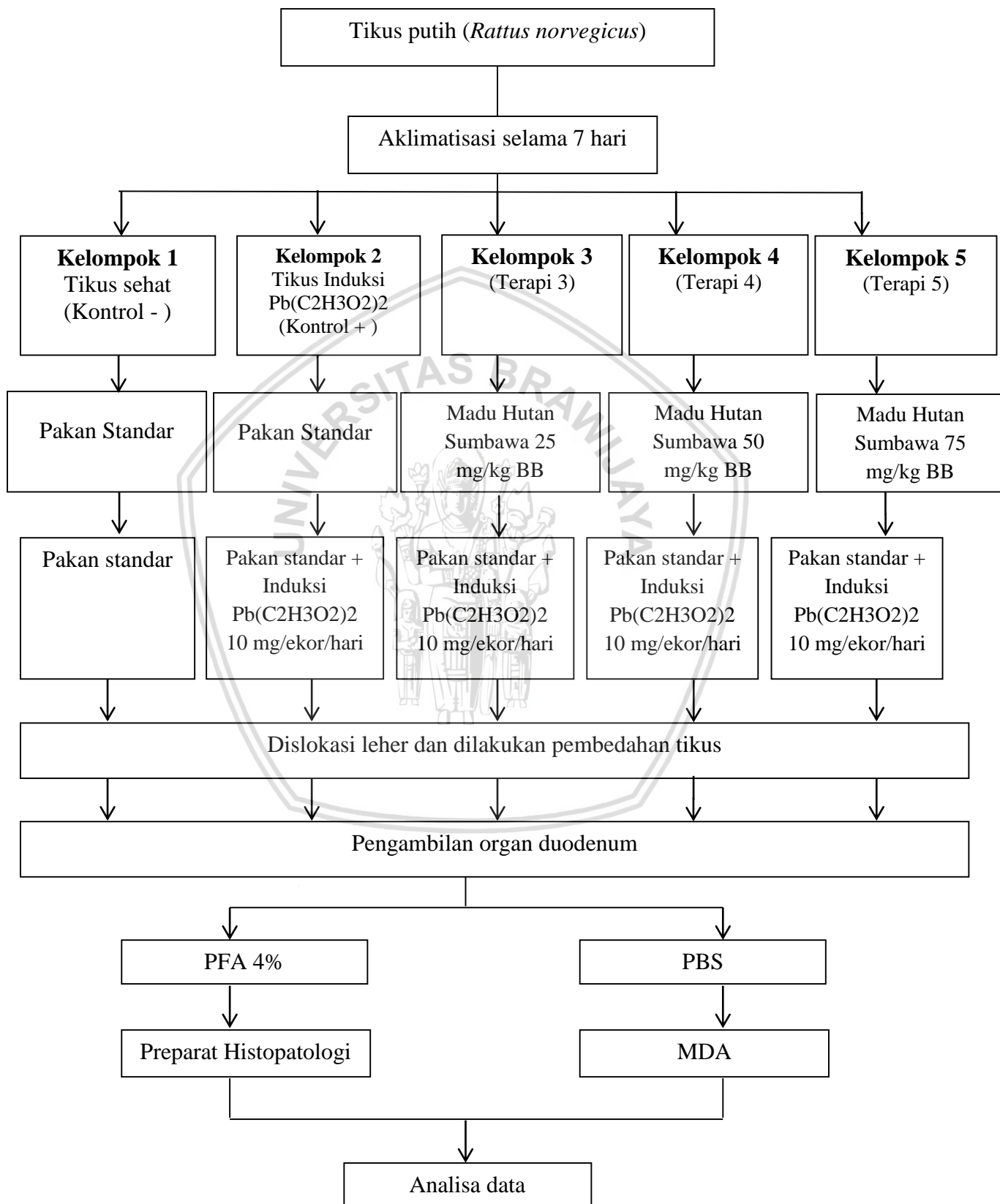
Widowati,W. 2009. *Efek Toksik Logam. Penerbit Andi: Yogyakarta.*

- Wijayanthi, K K. D., Berata, I. K., Samuri., dan Sudira I.W. 2017. *Histopatologi Usus Halus Tikus Jantan yang Diberikan Dekametason dan Vitamin E. Jurnal Veteriner Udayana* 9(1) : 47-53.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Winarsi, H. 2010. *Protein Kedelai dan Kecambah, Manfaatnya bagi Kesehatan, Cetakan I*. Kanisius. Yogyakarta. 170-171.
- Wuragil, LH. 2007. *Gambaran Histopatologi Pencernaan Tikus pada Pemberian Fraksi Asam Amino Non-Protein dan Fraksi Polifenol Lamtoro Merah (Acacia villosa)* [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yustika, R.A., Aulanni'am, dan Prasetyawan, S. 2013. *Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi pada Ginjal Tikus Putih (Rattus norvegicus) pasca induksi Cylosporine-A*. *Kimia Student Juornal*. Vol 1 No 2 pp 222-228.
- Zulhawa, D.J.,. 2010. *Daya Hambat Madu Sumbawa terhadap Pertumbuhan Kuman Staphylococcus aureus Isolat Infeksi Luka Operasi RS Islam Amal Sehat Sragen* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Surakarta.





Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Perhitungan Dosis Madu Hutan Sumbawa

Kelompok 3 (Dosis 25 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 25 mg/kg BB

Diketahui : rata-rata berat badan tikus adalah 200 g, 4 ekor dalam 1 kelompok

Konversi madu : 1 mL madu = 1210 mg

Diencerkan : madu : aquades = 1 : 9

1 mL larutan madu = 121 mg

$$\text{Dihitung : } \frac{200 \text{ g}}{1000} \times 25 \text{ mg/kg} = 5 \text{ mg/ekor}$$

Perhitungan volume madu untuk dosis 25 mg/kg BB

$$v_1 \times n_1 = v_2 \times n_2$$

$$v_1 \times 121 = 1 \times 5$$

$$4 \text{ mg}$$

$$v_1 = \frac{4 \text{ mg}}{121 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$v_1 = 0,041 \text{ mL}$$

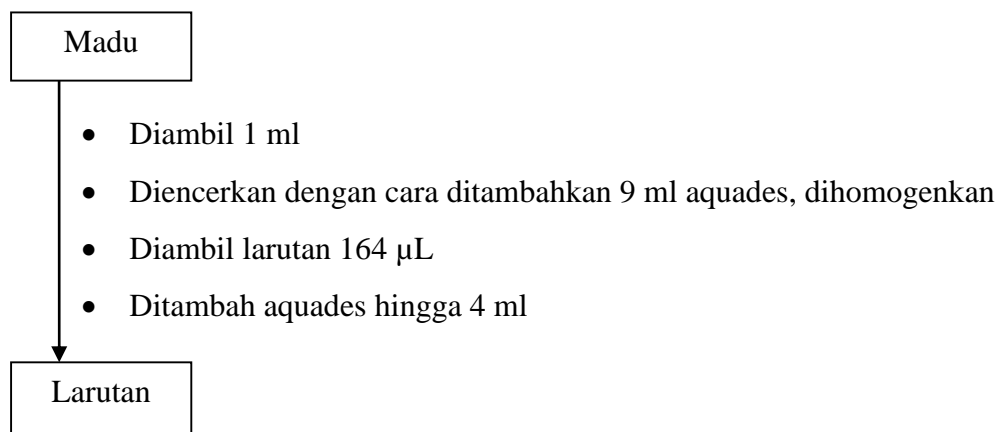
$$v_1 = 41 \text{ } \mu\text{L/ekor}$$

Volume pemberian 1 mL

4 ekor \times 41 μL = 164 μL \Rightarrow 164 μL dijadikan 4 ml dengan aquades

Dosis terapi = 25 mg/kg BB, untuk tikus berat 200 g = 41 $\mu\text{L/ekor}$ tikus. Diencerkan menggunakan aquades sampai dengan 1 mL/ekor tikus.

Diagram : (Jamilyadhatus, 2013)



Kelompok 4 (Dosis 50 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 50 mg/kg BB

Diketahui : rata-rata berat badan tikus adalah 200 g, 4 ekor dalam 1 kelompok

Konversi madu : 1 mL madu = 1210 mg

Diencerkan : madu : aquades = 1 : 9

1 mL larutan madu = 121 mg

Dihitung :
$$\frac{200 \text{ g}}{1000} \times 50 \text{ mg/kg} = 10 \text{ mg/ekor}$$

Perhitungan volume madu untuk dosis 50 mg/kg BB

$$v_1 \times n_1 = v_2 \times n_2$$

$$v_1 \times 121 = 1 \times 10$$

$$v_1 = \frac{10 \text{ mg}}{121 \text{ mg}}$$

$$v_1 = \frac{10 \text{ mg}}{121 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$v_1 = 0,083 \text{ mL}$$

$$v_1 = 83 \text{ } \mu\text{L/ekor}$$

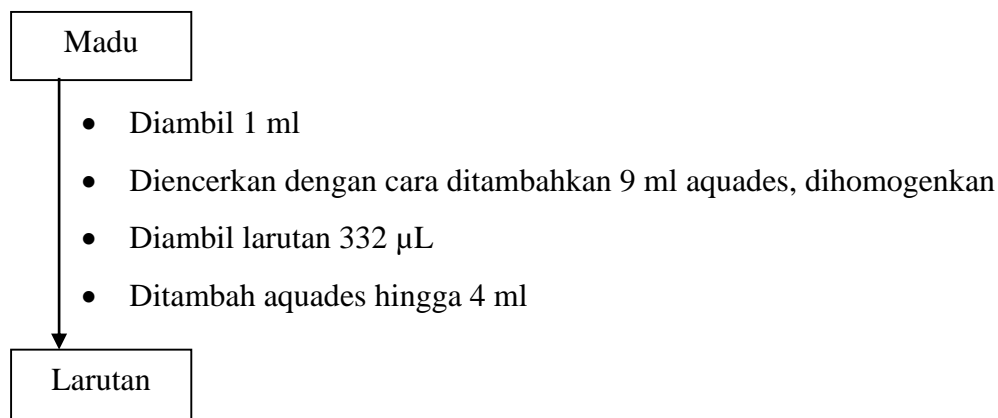
Volume pemberian 1 mL

4 ekor \times 83 μL = 332 μL \Rightarrow 332 μL dijadikan 4 ml dengan aquades

Dosis terapi = 50 mg/kg BB, untuk tikus berat 200 g = 83 $\mu\text{L/ekor}$ tikus.

Diencerkan menggunakan aquades sampai dengan 1 mL/ekor tikus.

Diagram : (Jamilyadhatus, 2013)



Kelompok 5 (Dosis 75 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 75 mg/kg BB

Diketahui : rata-rata berat badan tikus adalah 200 g, 4 ekor dalam 1 kelompok

Konversi madu : 1 mL madu = 1210 mg

Diencerkan : madu : aquades = 1 : 9

1 mL larutan madu = 121 mg

$$\text{Dihitung : } \frac{200 \text{ g}}{1000} \times 75 \text{ mg/kg} = 15 \text{ mg/ekor}$$

Perhitungan volume madu untuk dosis 75 mg/kg BB

$$v_1 \times n_1 = v_2 \times n_2$$

$$v_1 \times 121 = 1 \times 15$$

$$15 \text{ mg}$$

$$v_1 = \frac{15 \text{ mg}}{121 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$v_1 = 0,124 \text{ mL}$$

$$v_1 = 124 \text{ } \mu\text{L/ekor}$$

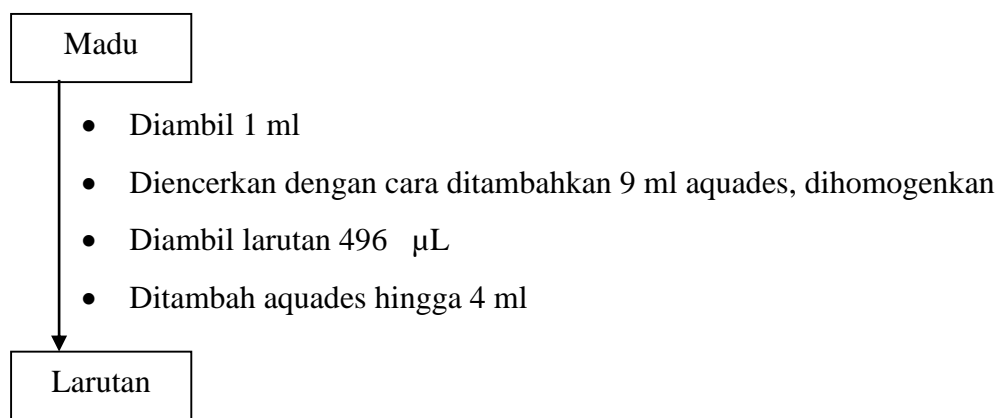
Volume pemberian 1 mL

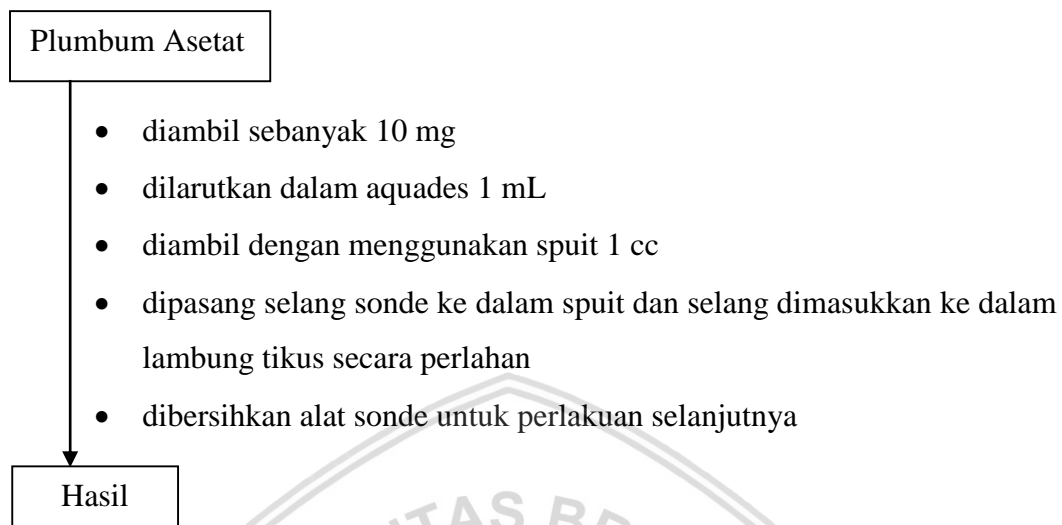
$$4 \text{ ekor} \times 124 \text{ } \mu\text{L} = 496 \text{ } \mu\text{L} \Rightarrow 496 \text{ } \mu\text{L} \text{ dijadikan } 4 \text{ ml dengan aquades}$$

Dosis terapi = 75 mg/kg BB, untuk tikus berat 200 g = 124 μL /ekor tikus.

Diencerkan menggunakan aquades sampai dengan 1 mL/ekor tikus.

Diagram : (Jamilyadhatus, 2013)



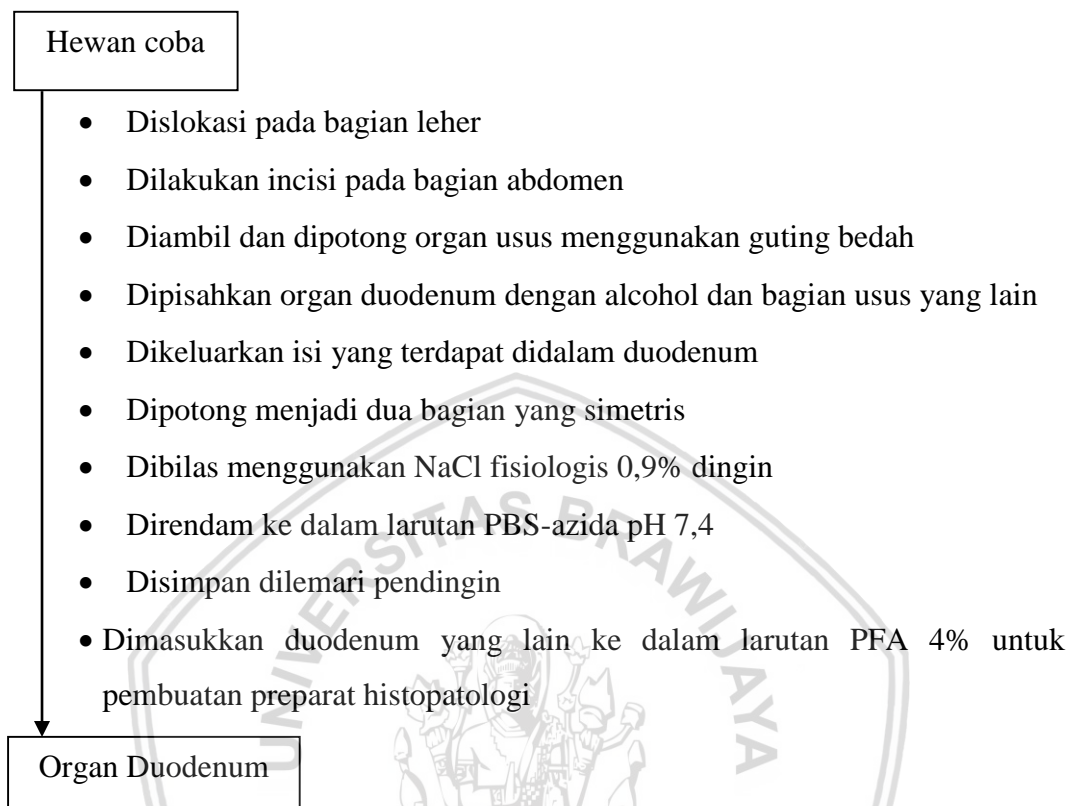
Lampiran 3. Pemberian Plumbum Asetat

Perhitungan volume pemberian Plumbum Asetat

1 ekor tikus = 10 mg/hari

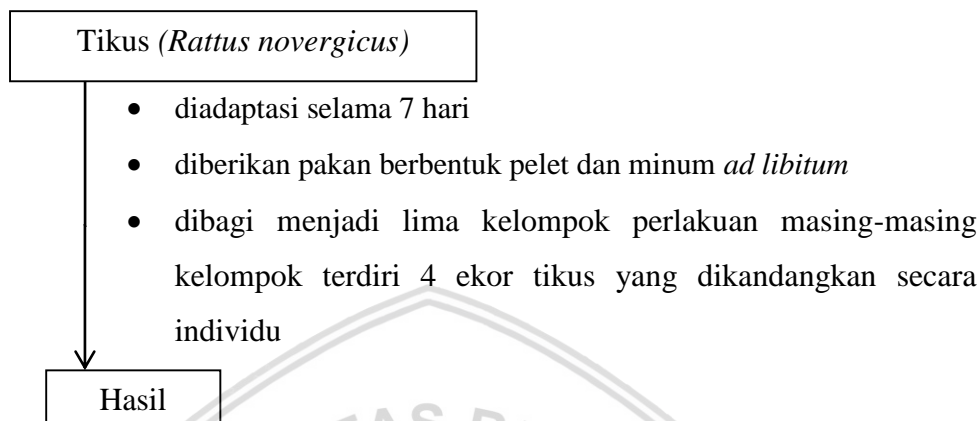
$$\begin{aligned}\text{Jumlah Plumbum Asetat yang dibutuhkan} &= 10 \text{ mg} \times \text{jumlah tikus} \\ &= 10 \text{ mg} \times 16 \text{ ekor} \\ &= 160 \text{ mg} \\ &= \mathbf{0,16 \text{ g / hari}}\end{aligned}$$

Plumbum asetat yang diberikan dilarutkan dalam 1 mL aquades sehingga volume satu kali pemberian adalah 1 mL/ekor/hari.

Lampiran 4. Isolasi Organ Duodenum

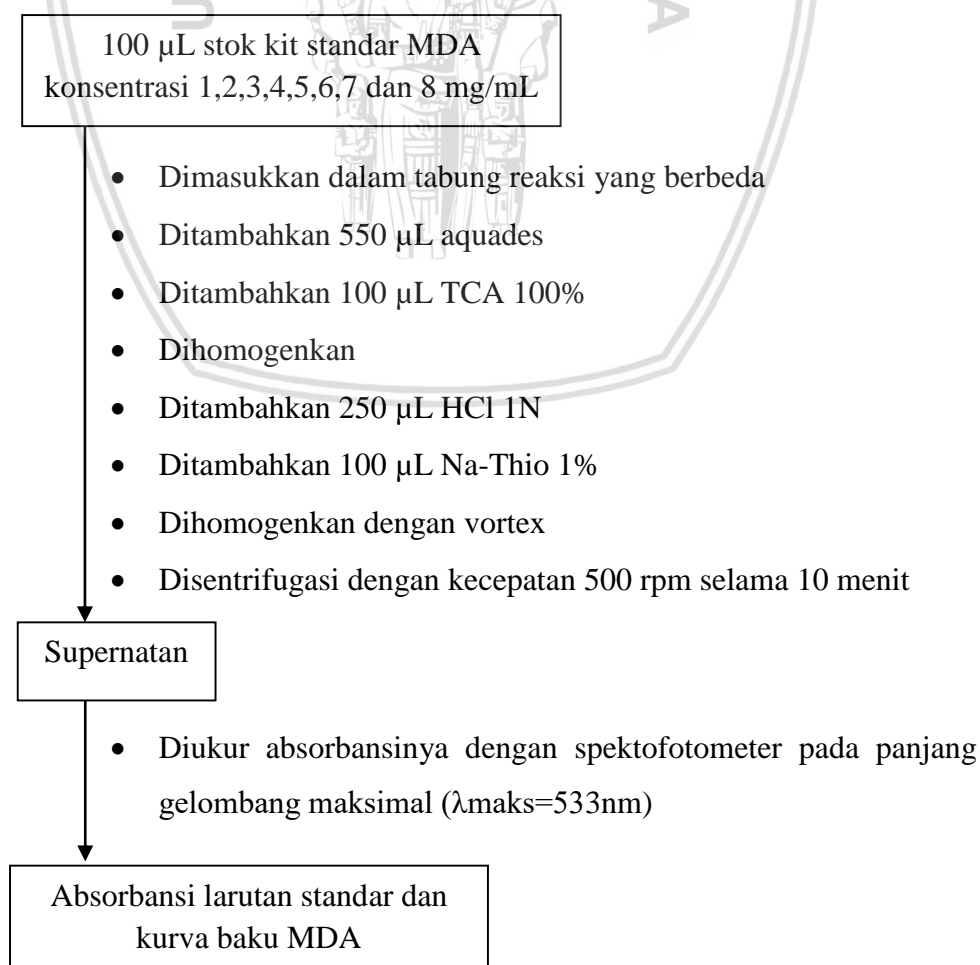
Lampiran 5. Langkah Kerja Penelitian

a. Persiapan Hewan Coba

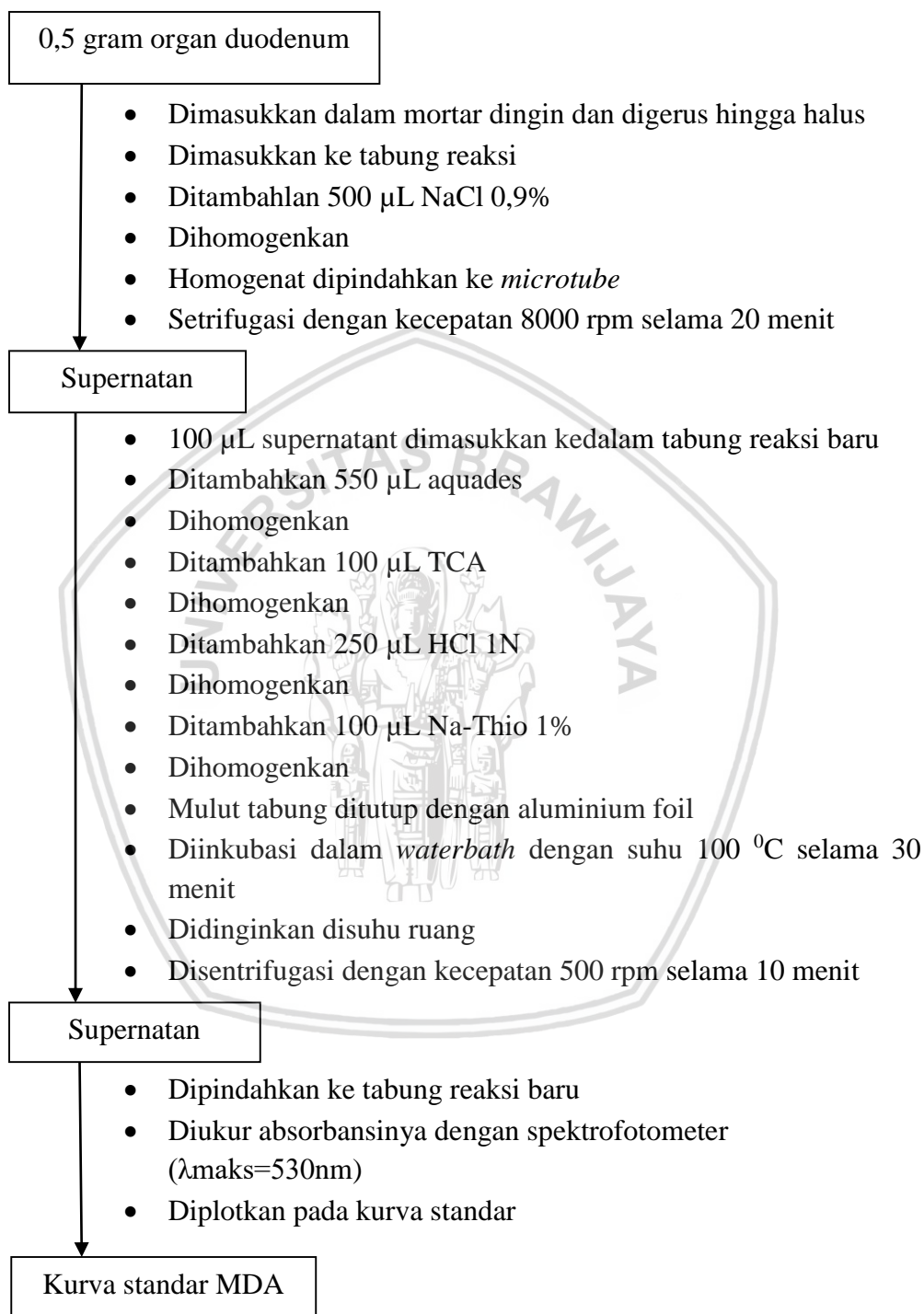


b. Malondialdehida (MDA)

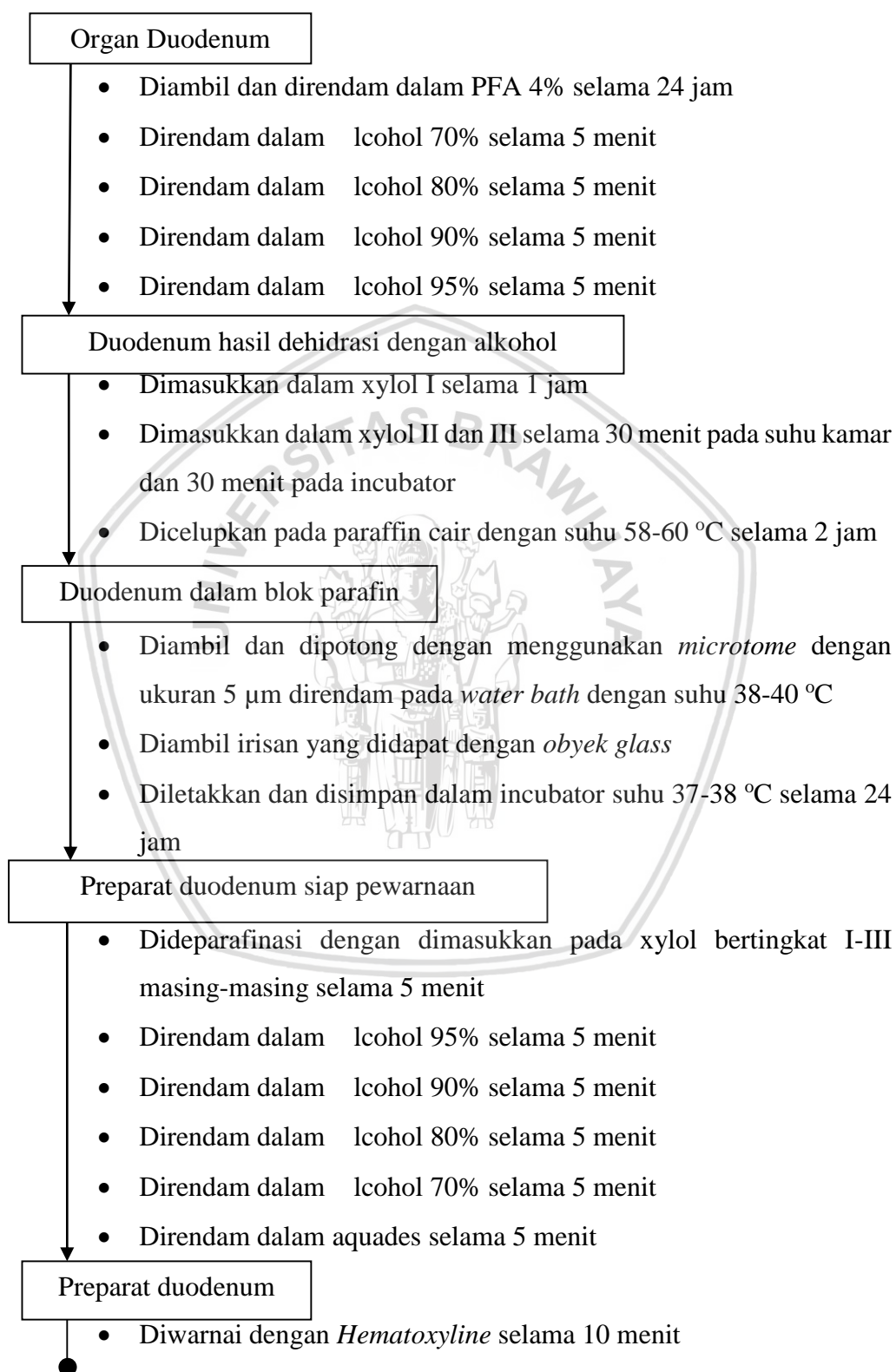
➤ Pembuatan Kurva Standar MDA



➤ **Pembuatan Kadar Malondialdehida (MDA) menggunakan uji TBA**

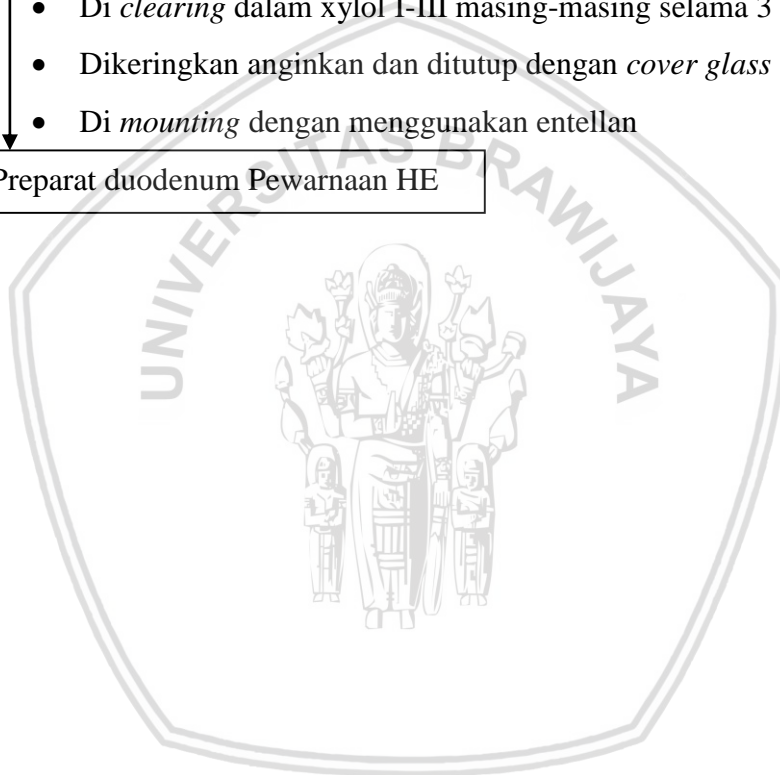


c. Pembuatan Preparat histopatologi





- Dicuci dengan aquades selama 5 menit
- Dimasukkan dalam pewarna *Eosin* selama 5 menit
- Dicuci dengan aquades selama 5 menit
- Dimasukkan dalam alcohol 70% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam alcohol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam alcohol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam alcohol 95% selama 5 menit
- Di *clearing* dalam xylol I-III masing-masing selama 3 menit
- Dikeringkan anginkan dan ditutup dengan *cover glass*
- Di *mounting* dengan menggunakan entellan

Preparat duodenum Pewarnaan HE



Lampiran 6. Sertifikat Laik Etik Penggunaan Hewan Model

	
KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA	
KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"	
No: 790-KEP-UB	
KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA	
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:	
PENELITIAN BERJUDUL	: PENGARUH TERAPI PREVENTIF MADU HUTAN SUMBAWA TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) YANG DIINDUKSI PLUMBUM (Pb)
PENELITI	: ARNES MARDASELLA
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK
Malang, 16 Juni 2017 Ketua Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya	
 Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001	

Lampiran 7. Hasil Uji Skrining Fitokimia Kandungan Flavanoid dan Vitamin C pada Madu Hutan Sumbawa

1. Hasil Uji Skrining Fitokimia Kandungan Flavanoid



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU – 65313

Nomor : 074 / 318 / 102.7 / 2017
 Sifat : Biasa
 Perihal : Surat Keterangan Skrining Fitokimia

Halaman : 1 dari 1

Memenuhi permohonan saudara :

Nama	NIM	Fakultas
Diana Anggraeni	135130101111045	Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
Putri Stefy Graf	135130101111004	
Ames Mardasella	135130107111027	
Cindy Oktati Kasari	135130101111058	
Olenka Putri Windarko	135130101111053	

Kami menerangkan bahwa yang bersangkutan telah melakukan Skrining Fitokimia untuk bahan penelitian dari sampel Madu asli Sumbawa. Adapun proses skrining dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu dengan perincian sebagai berikut :

Bahan : Sampel Madu Hutan Sumbawa HCl pekat
 Aquadest Serbuk Mg

Alat : Tabung reaksi Penjepit tabung reaksi Spatula stainless Corong gelas
 Pipet tetes Gelas ukur Beaker glass Bunsen

Cara Kerja :

II. Identifikasi Flavonoid

Sampel Madu Hutan Sumbawa → Ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan selama ± 10 menit → Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi → Ditambahkan HCl pekat beberapa tetes → Ditambahkan sedikit serbuk Mg → Hasil Positif: warna merah tua / merah muda

Hasil :

Nama Uji	Madu Hutan Asli Sumbawa
Flavonoid	+

Kesimpulan :

- Uji Flavonoid → Hasil Positif (+) mengandung flavonoid


Demikian keterangan ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 22 Agustus 2017
 Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin RM, Drs. Apt. MKes.
 NIP.19611102 199103 1 003



2. Hasil Uji Skrining Fitokimia Kandungan Vitamin C



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU – 65313

Nomor : 074 / 415 / 102.7 / 2017 Halaman : 1 dari 1
 Sifat : Biasa
 Perihal : Surat Keterangan Skrining Fitokimia

Memenuhi permohonan saudara :

Nama	NIM	Fakultas
Diana Anggraeni	135130101111045	Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
Putri Stefy Graf	135130101111004	
Arnes Mardasella	135130107111027	
Cindy Oktati Kasari	135130101111058	
Olenka Putri Windiarko	135130101111053	

Kami menerangkan bahwa yang bersangkutan telah melakukan Skrining Fitokimia untuk bahan penelitian dari sampel Madu Hutan Sumbawa. Adapun proses skrining dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu dengan perincian sebagai berikut :

Bahan : Sampel Madu Hutan Sumbawa Pereaksi Benedict
 Aquadest

Alat : Tabung reaksi Penjepit tabung reaksi Spatula stainless Corong gelas
 Pipet tetes Gelas ukur Beaker glass Bunsen

Cara Kerja :
I. Identifikasi Vitamin C
 2 ml sampel → Ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan selama ± 10 menit → Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi → Ditambahkan 5 tetes Pereaksi Benedict → Dipanaskan diatas api kecil hingga mendidih selama ± 2 menit → Hasil Positif: terdapat endapan berwarna hijau kekuningan sampai merah


Hasil :

Nama Sampel	Vitamin C
Madu Hutan Sumbawa	+

Kesimpulan :

- Uji Vitamin C → Hasil Positif (+) mengandung Vitamin C, ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna kuning

Demikian keterangan ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

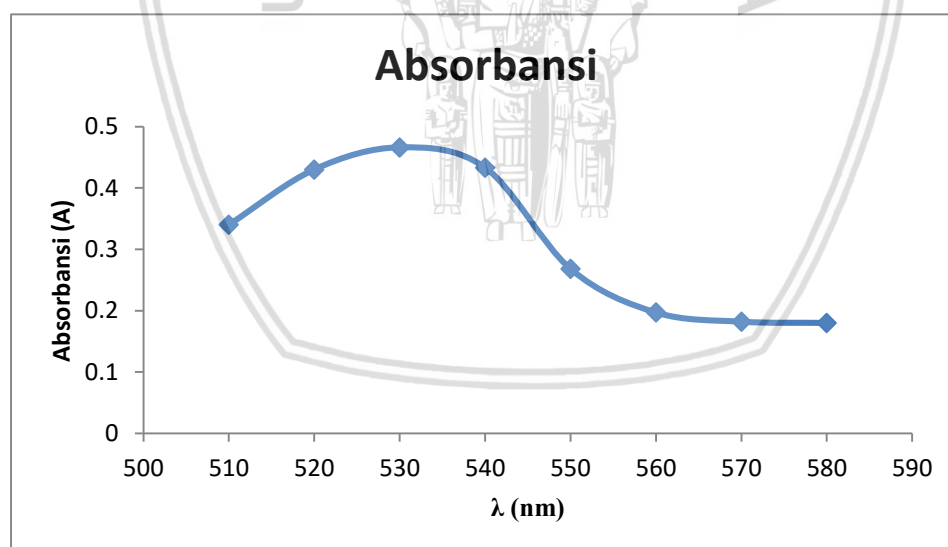
Batu, 30 November 2017
 Kepala UPT Materia Medica Batu

 Dr. Husin RM, Drs., Apt., MKes.

Lampiran 8 Kurva Standar kadar *Malondialdehida* (MDA) dan Perhitungan kadar

Malondialdehida (MDA)

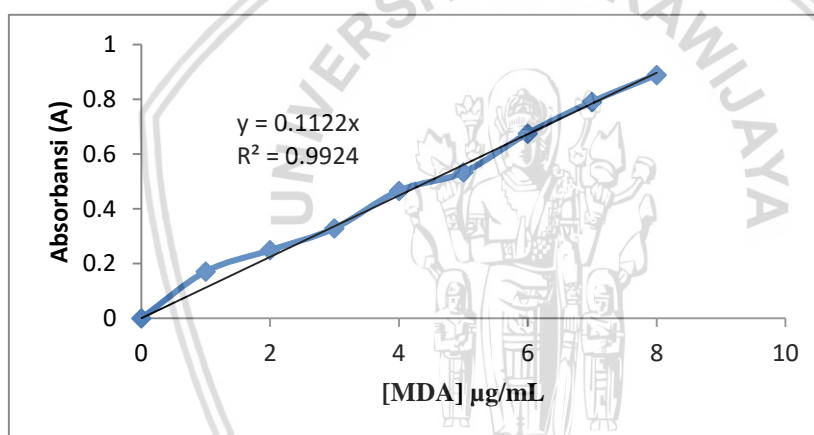
Tabel 8.1 Penentuan Panjang Gelombang Masimum

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
510	0,34
520	0,43
530	0,466
540	0,433
550	0,268
560	0,197
570	0,182
580	0,180



Tabel 8.2 Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Standar MDA dengan panjang gelombang maksimum 530 nm

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi
0	0
1	0,171
2	0,249
3	0,329
4	0,466
5	0,533
6	0,675
7	0,791
8	0,889



Tabel 8.3 Data Absorbansi MDA

Perlakuan	Absorbansi MDA			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	0,054	0,071	0,080	0,080
Kontrol positif	0,211	0,235	0,228	0,317
P1 25 mg/kg BB	0,126	0,141	0,136	0,106
P2 50 mg/kg BB	0,071	0,102	0,103	0,123
P3 75 mg/kg BB	0,068	0,075	0,087	0,081

Lampiran 9 Perhitungan Kurva MDA

Perhitungan kadar MDA dilakukan untuk semua nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA $y = 0,112 x$. Dimana kadar MDA sebagai nilai x dan absorbansi sebagai nilai y .

$$y = 0,112x$$

$$0,014 = 0,112x$$

$$x = 0,054 : 0,112$$

$$x = 0,481$$

Perlakuan	Kadar MDA ($\mu\text{g/mL}$)				Rata – Rata \pm SD
	1	2	3	4	
Kontrol negatif	0,482	0,634	0,714	0,714	$0,636 \pm 0,012^a$
Kontrol positif	1,884	2,098	2,036	2,830	$2,212 \pm 0,048^c$
P1 25 mg/kg BB	1,125	1,259	1,214	0,946	$1,136 \pm 0,016^b$
P2 50 mg/kg BB	0,634	0,911	0,920	1,098	$0,891 \pm 0,021^{ab}$
P3 75 mg/kg BB	0,607	0,670	0,777	0,723	$0,694 \pm 0,008^{ab}$

Tabel 9.1 Peningkatan dan Penurunan Kadar MDA

Kelompok	Rata-rata kadar MDA $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan dibanding kontrol negatif	Penurunan dibanding kontrol positif
Kontrol negatif	$0,636 \pm 0,012^a$	-	71,2%
Kontrol positif	$2,212 \pm 0,048^c$	121,2%	-
P1 25 mg/kg BB	$1,136 \pm 0,016^b$	-	48,6%
P2 50 mg/kg BB	$0,891 \pm 0,021^{ab}$	-	59,7%
P3 75 mg/kg BB	$0,694 \pm 0,008^{ab}$	-	68,6%

Peningkatan dan penurunan kadar MDA

a. Persentase peningkatan (%) = $\frac{\text{Rataan kontrol (+)} - \text{Rataan kontrol (-)}}{\text{Rataan kontrol (-)}} \times 100\%$

$$= \frac{(2,212 \mu\text{g/mL} - 0,636 \mu\text{g/mL}) \times 100\%}{0,636 \mu\text{g/mL}}$$

$$= 121,2\%$$

b. Persentase penurunan K-(%) = $\frac{\text{Rataan kontrol (+)} - \text{Rataan kontrol (-)}}{\text{Rataan kontrol (+)}} \times 100\%$

$$= \frac{(2,212 \mu\text{g/mL} - 0,636 \mu\text{g/mL}) \times 100\%}{2,212 \mu\text{g/mL}}$$

$$= 71,2\%$$

c. Persentase penurunan P1 (%) = $\frac{\text{Rataan P1} - \text{Rataan kontrol (+)}}{\text{Rataan kontrol (+)}} \times 100\%$

$$= \frac{(1,136 \mu\text{g/mL} - 2,212 \mu\text{g/mL}) \times 100\%}{2,212 \mu\text{g/mL}}$$

$$= 48,6\%$$

d. Persentase penurunan P2 (%) = $\frac{\text{Rataan P2} - \text{Rataan kontrol (+)}}{\text{Rataan kontrol (+)}} \times 100\%$

$$= \frac{(0,891 \mu\text{g/mL} - 2,212 \mu\text{g/mL}) \times 100\%}{2,212 \mu\text{g/mL}}$$

$$= 59,7\%$$

e. Persentase penurunan P3 (%) =
$$\frac{\text{Rataan P3} - \text{Rataan kontrol (+)}}{\text{Rataan kontrol (+)}} \times 100\%$$

$$= \frac{(0,694 \mu\text{g/mL} - 2,212 \mu\text{g/mL}) \times 100\%}{2,212 \mu\text{g/mL}}$$
$$= 68,6\%$$



Lampiran 10 Perhitungan Statistik

a. Analisa Deskriptif

Descriptive

Kadar MDA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (-)	4	,0713	,01226	,00613	,0517	,0908	,05	,08
Kontrol (+)	4	,2477	,04725	,02363	,1726	,3229	,21	,32
Perlakuan 1	4	,1273	,01548	,00774	,1026	,1519	,11	,14
Perlakuan 2	4	,0997	,02147	,01073	,0656	,1339	,07	,12
Perlakuan 3	4	,0778	,00814	,00407	,0648	,0907	,07	,09
Total	20	,1248	,06988	,01563	,0920	,1575	,05	,32

b. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kadar MDA	Kelompok
N		20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,1248	3,0000
	Std. Deviation	,06988	1,45095
Most Extreme Differences	Absolute	,208	,155
	Positive	,208	,155
	Negative	-,158	-,155
Test Statistic		,208	,155
Asymp. Sig. (2-tailed)		,023 ^c	,200 ^{c,d}

Interpretasi

H0 = Distribusi data normal

H1 = Distribusi data tidak normal

Berdasarkan uji normalitas didapatkan signifikansi sebesar 0,2 yang artinya nilai ini lebih besar dari pada $\alpha = 0,05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H_0 distribusi data normal dan dapat dilanjutkan uji ANOVA.

c. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Kadar MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,203	4	15	,171

Interpretasi :

H_0 = Varian data homogen

H_1 = Varian data tidak homogen

Berdasarkan hasil uji homogenitas didapat signifikansi sebesar 0,171 yang artinya lebih besar dari $\alpha = 0,05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H_0 yang menyatakan varian data homogen.

d. Uji ANOVA

ANOVA

Kadar MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,083	4	,021	33,067	,000
Within Groups	,009	15	,001		
Total	,093	19			

Interpretasi :

H_0 = Semua kelompok sama

H_1 = Salah satu atau lebih kelompok ada yang berbeda

Jika $p < \alpha$, maka H_1 diterima

Jika $p > \alpha$, maka H_0 diterima

Berdasarkan uji Anova di dapat P. value atau signifikansi sebesar 0,088 artinya nilai tersebut lebih kecil dari pada $\alpha = 0,05$, sehingga hipotesis yang diambil adalah H1 yang menyatakan terdapat salah satu atau lebih kelompok ada yang berbeda. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan tingkat kesalahan 5 % sudah cukup membuktikan bahwa terdapat pengaruh pemberian madu hutan Sumbawa sebagai terapi preventif terhadap kadar MDA duodenum tikus hasil induksi plumbum aetat. Untuk mengetahui kelompok yang berbeda maka data diuji dengan uji BNJ atau uji Tukey.

e. Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar MDA
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-,17650*	,01775	,000	-,2313	-,1217
	Perlakuan 1	-,05600*	,01775	,044	-,1108	-,0012
	Perlakuan 2	-,02850	,01775	,516	-,0833	,0263
	Perlakuan 3	-,00650	,01775	,996	-,0613	,0483
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	,17650*	,01775	,000	,1217	,2313
	Perlakuan 1	,12050*	,01775	,000	,0657	,1753
	Perlakuan 2	,14800*	,01775	,000	,0932	,2028
	Perlakuan 3	,17000*	,01775	,000	,1152	,2248
Perlakuan 1	Kontrol Negatif	,05600*	,01775	,044	,0012	,1108
	Kontrol Positif	-,12050*	,01775	,000	-,1753	-,0657
	Perlakuan 2	,02750	,01775	,549	-,0273	,0823
	Perlakuan 3	,04950	,01775	,086	-,0053	,1043
Perlakuan 2	Kontrol Negatif	,02850	,01775	,516	-,0263	,0833
	Kontrol Positif	-,14800*	,01775	,000	-,2028	-,0932
	Perlakuan 1	-,02750	,01775	,549	-,0823	,0273

	Perlakuan 3	,02200	,01775	,730	-.0328	,0768
Perlakuan 3	Kontrol Negatif	,00650	,01775	,996	-.0483	,0613
	Kontrol Positif	-,17000*	,01775	,000	-,2248	-,1152
	Perlakuan 1	-,04950	,01775	,086	-,1043	,0053
	Perlakuan 2	-,02200	,01775	,730	-,0768	,0328

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

f. Uji Tukey

Kadar MDA

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol Negatif	4	,0713		
Perlakuan 3	4	,0778	,0778	
Perlakuan 2	4	,0997	,0997	
Perlakuan 1	4		,1273	
Kontrol Positif	4			,2477
Sig.		,516	,086	1,000